

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO BIOLOGIA VEGETAL



Avaliação da segurança alimentar de framboesas irradiadas por feixe de elétrons

Maria Inês Andrade Elias

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada por:
Doutora Sandra Cabo Verde
Professora Doutora Maria Manuela Carolino



O trabalho apresentado nesta Dissertação de Mestrado foi realizado no Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares sob a orientação direta da Doutora Sandra Cabo Verde

A Professora Doutora Maria Manuela Carolino foi a orientadora interna, designado no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Agradecimentos

Quero agradecer especialmente à Doutora Sandra Cabo Verde por me ter apoiado durante este ano todo, por me ter ensinado tanto e por ter sempre uma palavra amiga nos momentos difíceis. Agradeço também à Joana Madureira que me ajudou a realizar certas partes laboratoriais como também a escrever a tese. Quero dar um agradecimento especial à minha amiga e colega de laboratório Joana Roque, que sempre me apoiou e ajudou a ultrapassar dificuldades durante o ano inteiro.

Agradeço à minha orientadora interna Maria Manuela Spratley Carolino por toda a ajuda obtida durante este processo.

Quero também agradecer à minha instituição de ensino Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, como também ao C2TN (Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares) do Instituto Superior Técnico, especialmente ao LETAL (Laboratório de Ensaios Tecnológicos em Áreas Limpas), onde realizei a maioria do meu trabalho, como também à IRIS (Instalação de Radiações Ionizantes), onde as minhas amostras foram irradiadas por feixe de eletrões.

Por fim, quero agradecer à minha família e amigos pelo carinho que me deram ao longo do ano, especialmente às minha amigas Carolina Almeida e Patrícia Bastião por me apoiarem e me fazerem rir nos momentos mais difíceis.

Resumo - Palavras-chave

É reconhecida globalmente a necessidade de aumentar o consumo de frutas e vegetais, descritos como fontes de fibra dietética e de nutrientes essenciais (vitaminas e minerais), que contribuem para a prevenção de doenças crônicas. As framboesas (*Rubus idaeus* L.) são frutas perecíveis e normalmente consumidas frescas e sem qualquer tipo de tratamento, sendo consideradas veículos de transmissão de diversos tipos de agentes patogênicos. As doenças transmitidas por alimentos constituem um problema de saúde pública a nível global, especialmente as que são causadas por microrganismos patogênicos. Assim, é necessário encontrar um tratamento pós-colheita eficaz para alimentos sensíveis, como as framboesas, que garanta a sua segurança e qualidade.

De modo a avaliar a segurança e qualidade de framboesas tratadas por feixe de elétrons foram realizados quatro ensaios. O primeiro pretendeu estudar a inativação da microbiota natural das framboesas. Neste ensaio foram aplicadas 3 doses de radiação diferentes (1,5 kGy, 3 kGy, e 5 kGy) com a finalidade de estimar a sobrevivência de 2 tipos de população microbiana (bacteriana mesófila e fúngica), durante 14 dias de armazenamento refrigerado. Os resultados correspondentes à população bacteriana mesófila indicaram uma diminuição de aproximadamente 2 log UFC/g em framboesas irradiadas à dose de 3 kGy. Esta redução manteve-se inalterada após 7 dias de armazenamento refrigerado. Para a população fúngica, foi observada uma redução de 3 log UFC/g em framboesas irradiadas à dose de 3 kGy durante 7 dias de armazenamento refrigerado.

No segundo ensaio foi caracterizada e identificada a microbiota natural das framboesas. Os resultados obtidos sugerem a existência de uma população diversa com predominância de leveduras e bactérias Gram negativas, possivelmente provenientes do solo, água da rega, e manipulação humana durante processamento das frutas. De uma forma geral foi observada a diminuição da diversidade microbiana com a irradiação por feixe de elétrons.

No terceiro ensaio foi avaliada a inativação por feixe de elétrons de microrganismos potencialmente patogênicos inoculados artificialmente em framboesas. Os resultados revelaram a inativação das bactérias *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* Typhimurium à dose de 3 kGy, não sendo detetadas nas framboesas tratadas a esta dose e armazenadas durante 14 dias.

O quarto ensaio baseou-se na análise do efeito do tratamento por feixe de elétrons no conteúdo bioativo das framboesas, através da determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais, da atividade antioxidante e teor em ácido ascórbico (vitamina C). Os resultados, de uma forma geral, indicaram a preservação do conteúdo em compostos fenólicos e da atividade antioxidante nos extratos de framboesas tratadas a 3 kGy durante 7 dias em armazenamento refrigerado. Contudo verificou-se uma perda do conteúdo em ácido ascórbico com o tratamento por feixe de elétrons, efeito este acentuado pelo armazenamento refrigerado.

Em suma, os resultados obtidos sugerem que a segurança alimentar das framboesas pode ser assegurada pela utilização da irradiação por feixe de elétrons à dose de 3 kGy, como tratamento pós-colheita, com uma potencial extensão do seu tempo de prateleira até 7 dias.

Palavras-chave: framboesas; feixe de elétrons; inativação microbiana; irradiação de alimentos; segurança alimentar; conteúdo bioativo.

Abstract - Key words

It is globally recognized that it is needed to increase the consumption in fruits and vegetables, described as sources of dietary fiber and essential nutrients (vitamins and minerals), that contributes to the prevention of chronic diseases. Raspberries (*Rubus idaeus* L.) are perishable fruits that are normally consumed fresh and untreated, being considered vehicles of transmission of various types of human pathogens. Foodborne diseases are a global public health issue, especially those caused by pathogenic microorganisms. Thus, it is necessary to develop an effective postharvest treatment for sensitive foods such as raspberries that ensures their safety and quality.

In order to evaluate the safety and quality of raspberries treated by electron beam technology, four assays were performed. The first aimed to study the inactivation of the raspberries' natural microbiota. In this trial, 3 different electron beam radiation doses (1.5 kGy, 3 kGy, and 5 kGy) were applied to estimate the survival of 2 types of microbial population (mesophilic bacterial and fungal) during 14 days of refrigerated storage. The obtained results for the mesophilic bacterial population indicated a decrease of approximately 2 log CFU/g in the treated raspberries at a dose of 3 kGy. This result was maintained after 7 days of refrigerated storage. For the fungal population, the inactivation results indicated a decrease of 3 log CFU/g in irradiated raspberries at a dose of 3 kGy during 7 days of refrigerated storage.

In the second assay, the natural microbiota of raspberries was characterized and identified. The results suggested the presence of a diverse population with predominance of yeast and Gram negative bacteria, possibly from soil, irrigation water, and human manipulation during fruit processing. In general, it was observed a decrease of the microbial diversity with electron beam irradiation.

The third trial, intended to study the inactivation of potentially pathogenic microorganisms in inoculated raspberries. The results indicated that *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Typhimurium were inactivated at a dose of 3 kGy, being not detected on the raspberries treated at this dose and stored during the 14 days.

The fourth trial focused in the analysis of the effects of e-beam treatment on the bioactive content of raspberries, through the determination of the total phenolic content, antioxidant activity and ascorbic acid content. Generally, the results indicated the preservation of phenolic compounds content and antioxidant activity in the extracts of raspberries treated at 3 kGy for 7 days of refrigerated storage. However, it was detected a loss of ascorbic acid content with electron beam treatment, effect that was accentuated with the refrigerated storage.

In conclusion, the results highlighted that electron beam treatment at a dose of 3 kGy could be used as a post-harvest treatment for raspberries, with a potential shelf life extension up to 7 days.

Keywords: raspberries; electron beam treatment; microbial inactivation; food irradiation; food safety, bioactive content.

Índice

Agradecimentos.....	III
Resumo - Palavras-chave	IV
Abstract - Key words.....	V
Índice de figuras	VIII
Índice de tabelas	X
Lista de abreviaturas e siglas	XI
Lista de unidades	XII
1. Introdução.....	1
1.1 Framboesas.....	1
1.2 Surto em framboesas.....	2
1.4 Irradiação por feixe de elétrons e mecanismos de inativação microbiana.....	3
1.5 Cinética de inativação microbiana.....	3
1.6 Legislação de alimentos irradiados na união europeia	4
1.7 Aplicações alimentares da tecnologia de irradiação por feixe de elétrons	5
2. Problemática.....	7
3. Objetivos	8
4. Materiais e Métodos	9
4.1 Irradiação das framboesas	9
4.1 Estudo do efeito do armazenamento.....	9
4.3 Inativação da microbiota natural de framboesas	9
4.4 Caracterização macroscópica, microscópica e identificação da microbiota natural de framboesas	10
4.5 Inativação de microrganismos potencialmente patogênicos	10
4.6 Extração de compostos fenólicos	10
4.7 Avaliação da atividade antioxidante.....	11
4.7.1 Free radical scavenging activity – DPPH.....	11
4.7.2 Ferric reducing antioxidant power – FRAP.....	11
4.8 Conteúdo de fenólicos totais	11
4.9 Determinação do conteúdo em ácido ascórbico (vitamina C)	11
5. Resultados e discussão	13
5.1 Inativação e quantificação da microbiota natural de framboesas	13
5.1.1 População bacteriana mesófila	13
5.1.2 População fúngica	14
5.2 Identificação da microbiota natural das framboesas.....	14
5.2.1 Bactérias mesófilas logo após tratamento (tempo 0).....	15
5.2.2 Bactérias mesófilas presentes 3 dias após tratamento (tempo3).....	15
5.2.3 Bactérias mesófilas 7 dias após tratamento (tempo 7)	16

5.2.4 Bactérias mesófilas presentes 14 dias após o tratamento (tempo 14).....	17
5.2.5 Fungos filamentosos e leveduriformes logo após tratamento (tempo 0).....	18
5.2.6 Fungos filamentosos e leveduriformes presentes 3 dias após tratamento (tempo 3).....	19
5.2.7 Fungos filamentosos e leveduriformes 7 dias após tratamento (tempo 7).....	20
5.2.8 Fungos filamentosos e leveduriformes 14 dias após tratamento (tempo 14).....	21
5.3 Inativação de microrganismos potencialmente patogênicos	22
5.3.1 <i>Escherichia coli</i>	22
5.3.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	23
5.3.3 <i>Salmonella typhimurium</i>	24
5.4 Avaliação dos efeitos do tratamento por feixe de elétrons no conteúdo bioativo das framboesas	25
5.4.1 Conteúdo fenólico e atividade antioxidante dos extratos de framboesa.....	25
5.4.2 Conteúdo em ácido ascórbico (vitamina C)	26
6. Conclusão	27
7. Bibliografia.....	28

Índice de figuras

• Figura 1.1: Framboesas vermelhas (<i>Rubus idaeus</i> L.)	1
• Figura 1.2: Símbolo internacional de irradiação de alimentos – Radura.....	5
• Figura 5.1: Sobrevivência da população bacteriana mesófila de framboesas tratadas por feixe de eletrões, logo após tratamento (t_0), após 3 dias (t_3), após 7 dias (t_7) e após 14 dias (t_{14}) de armazenamento refrigerado.	13
• Figura 5.2: Sobrevivência da população fúngica de framboesas tratadas por feixe de eletrões, logo após tratamento (t_0), após 3 dias (t_3), após 7 dias (t_7) e após 14 dias (t_{14}) de armazenamento refrigerado.	14
• Figura 5.3: Bactérias mesófilas presentes nas framboesas não tratadas e logo após tratamento (t_0) a várias doses de radiação por feixe de eletrões.	15
• Figura 5.4: Bactérias mesófilas presentes nas framboesas não tratadas após 3 dias de armazenamento e 3 dias após tratamento (t_3) a várias doses de radiação por feixe de eletrões.	16
• Figura 5.5: Bactérias mesófilas presentes nas framboesas não tratadas após 7 dias de armazenamento e 7 dias após tratamento (t_7) a várias doses de radiação por feixe de eletrões.	17
• Figura 5.6: Bactérias mesófilas presentes nas framboesas não tratadas após 14 dias de armazenamento e 14 dias após tratamento (t_{14}) a várias doses de radiação por feixe de eletrões.	18
• Figura 5.7: Fungos filamentosos e leveduriformes presentes nas framboesas não tratadas e logo após tratamento (t_0) a várias doses de radiação por feixe de eletrões.....	19
• Figura 5.8: Fungos filamentosos e leveduriformes presentes nas framboesas não tratadas após 3 dias de armazenamento e 3 dias após tratamento (t_3) a várias doses de radiação por feixe de eletrões.	20
• Figura 5.9: Fungos filamentosos e leveduriformes presentes nas framboesas não tratadas após 7 dias de armazenamento e 7 dias após tratamento (t_7) a várias doses de radiação por feixe de eletrões.	21
• Figura 5.10: Fungos filamentosos e leveduriformes presentes nas framboesas não tratadas após 14 dias de armazenamento e 14 dias após tratamento (t_{14}) a várias doses de radiação por feixe de eletrões.....	21
• Figura 5.11: Sobrevivência de <i>Escherichia coli</i> inoculada artificialmente em framboesas tratadas por feixe de eletrões, logo após tratamento (t_0), após 3 dias (t_3), 7 dias (t_7) e 14 dias (t_{14}) de armazenamento refrigerado.	22

- Figura 5.12: Sobrevivência de *Listeria monocytogenes* inoculada artificialmente em framboesas tratadas por feixe de elétrons, logo após tratamento (t_0), após 3 dias (t_3), 7 dias (t_7) e 14 dias (t_{14}) de armazenamento refrigerado..... 23
- Figura 5.13: Sobrevivência de *Salmonella Typhimurium* inoculada artificialmente em framboesas tratadas por feixe de elétrons, logo após tratamento (t_0), após 3 dias (t_3), 7 dias (t_7) e 14 dias (t_{14}) de armazenamento refrigerado..... 24
- Figura 5.14: Efeito da radiação por feixe de elétrons no conteúdo em ácido ascórbico (mg/100g de peso seco) das framboesas durante armazenamento..... 26

Índice de tabelas

- Tabela 5.1: Atividade antioxidante (atividade scavenging do DPPH e FRAP) e Conteúdo fenólico total nos extratos de framboesas não irradiadas e irradiadas analisadas imediatamente após a irradiação por feixe de elétrons e durante 14 dias de armazenamento refrigerado..... 25

Lista de abreviaturas e siglas

DNA: Ácido DesoxirriboNucleico do inglês “DeoxyriboNucleic Acid”

RNA: Ácido RiboNucleico do inglês “RiboNucleic Acid”

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

OMS: Organização Mundial de Saúde

FAO: *Food and Agricultural Organization*

FDA: *Food and Drugs Administration*

EU: União Europeia

LINAC: Acelerador Linear de elétrons, do inglês “LINear ACelerator”

FTW-60: *Far West Technology, Inc.*

TSA: *Trypticase Soy Agar*

MEA: *Malt Extract Agar*

UV: Ultra Violeta

Lista de unidades

%: percentagem

kcal: quilocalorias

MeV: Mega eletrão Volt

kGy: kilogray

Gy: gray

kJ: kilojoule

J: joule

Log: logaritmo base 10

N0: número inicial de microrganismos na suspensão irradiada

N: número inicial de organismos que sobreviveram à dose de radiação

D10: dose necessária para inativar 90% de uma população microbiana

°: grau

°C: graus Célsio

h: hora

min: minutos

ml: mililitro

µl: microlitro

mM: milimolar

kg: quilograma

g: gramas

mg: miligrama

m²: metros quadrados

nm: nanometros

1. Introdução

1.1 Framboesas

É reconhecido globalmente a necessidade de aumentarmos o nosso consumo de frutas e vegetais, como uma boa fonte de fibra dietética, nutrientes essenciais como vitaminas e minerais para uma boa manutenção da saúde humana e diminuição do risco de doenças crónicas (Boeing et al., 2012; Havas et al., 1994).

As framboesas vermelhas (*Rubus idaeus* L.) contêm uma grande variedade de compostos benéficos, que incluem minerais essenciais, vitaminas, ácidos gordos e fibra dietética como também uma grande gama de fitoquímicos polifenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos, lignanas e taninos) (Kähkönen, Hopia, & Heinonen, 2001). Estas moléculas estão naturalmente presentes nas framboesas, levando a que possuam uma grande capacidade antioxidante, prevenindo o stresse oxidativo causado por radicais livres (Kafkas, Özgen, Özoğul, & Türemiş, 2008; Rao & Snyder, 2010).

Devido ao seu perfil nutricional, as framboesas são reconhecidas como uma boa escolha alimentar. As framboesas têm baixo teor em calorias, pelo que uma dose de 100g apenas possui 52 kcal (Ahuja et al., 2013). Devido a este facto e por serem doces, estas frutas tornam-se uma boa alternativa a alimentos processados e com baixa qualidade nutricional. Neste sentido, as framboesas ajudam a regular o açúcar no sangue, dada a sua concentração em frutose, e proporcionam uma digestão mais lenta e, conseqüentemente, um efeito saciante tendo em conta a concentração em fibra dietética que possuem. As sementes das framboesas contêm cerca de 97,8% de ácidos gordos insaturados e um baixo conteúdo em ácidos gordos, sendo por isso uma fonte saudável de óleos essenciais (Parry et al., 2005). Estas sementes possuem também vitaminas solúveis em gordura, como carotenoides e tocoferóis, sendo que a grande quantidade de vitamina C, que é solúvel em água, se encontra na parte carnuda da fruta (Kähkönen et al., 2001).



Figura 1.1: Framboesas vermelhas (Rubus idaeus L.)

As framboesas são frutas perecíveis, normalmente consumidas frescas e sem qualquer tipo de tratamento, sendo consideradas veículos de transmissão de diversos tipos de agentes patogénicos que podem causar doença no ser humano (Berger et al., 2010). Como tal, existe a necessidade de desenvolver um tratamento eficaz e sustentável para o controlo da carga microbiana natural e patogénica, que garanta a saúde pública e permita igualmente a extensão do tempo de prateleira deste tipo de frutas. O tratamento de alimentos para controlo microbiológico não poderá influenciar ou alterar as qualidades organoléticas dos alimentos, tendo de permitir um alargamento do tempo de vida útil do alimento, traduzindo-se assim numa diminuição do desperdício alimentar.

As frutas são muito sensíveis a condições de processamento não adequadas, especialmente pequenos frutos como as framboesas vermelhas. É imperativo que exista processamentos pré-colheita (durante o crescimento do fruto na árvore ou arbusto), durante a colheita (o ato de retirar o fruto do seu local de crescimento), como também pós-colheita (processamento, armazenamento e transporte do fruto), para que a qualidade do produto não diminua e para que possa ser comercializado (Terry, 2012). Os processamentos pretendem atrasar a maturação, reduzir a contaminação microbiológica, ou ainda suportar condições de refrigeração. Os tratamentos de fumigação foram muito utilizados como processo de desinfecção durante o armazenamento e quarentena dos alimentos a serem comercializados. Todavia, tem sido demonstrado que a maioria destes químicos são carcinogênicos ou potencialmente adversos para o ambiente, tendo também efeitos nocivos para a saúde humana (J Nieuwenhuijsen, 2000). Atualmente recorre-se ao uso de substâncias químicas, embalagens especiais com atmosfera modificada, tratamentos térmicos, químicos ou físicos de modo a preservar este tipo de comodidades alimentares. O uso destas tecnologias leva a perdas significativas nas propriedades físico-químicas de alguns alimentos tais como os pequenos frutos (Milutinović, Nikolić, Milivojević, Milutinović, & Daković, 2008). De facto, as frutas ficam com cores, sabores e texturas alteradas, levando a que o consumidor não as adquira. Assim sendo, os processos atualmente utilizados são pouco eficientes, podendo ter efeitos nocivos para a saúde humana ao deixarem resíduos no alimento e no ambiente, comprometendo a qualidade alimentar e saúde pública. A refrigeração e a congelação são também métodos de preservação utilizados em certos tipos de alimentos, contudo, estes processos são realizados depois da apanha dos frutos conduzindo a uma diminuição das qualidades organolépticas dos mesmos (Milutinović et al., 2008). Com base no que foi mencionado anteriormente, torna-se assim necessário encontrar um tratamento pós-colheita eficaz para alimentos sensíveis como a fruta que garanta a sua qualidade e segurança.

1.2 Surto em framboesas

Como referido anteriormente, têm sido observados vários surtos infecciosos devido ao consumo de framboesas ao longo dos anos.

De acordo com a literatura existente, ocorreu em 1983 na cidade de Aberdeen (Escócia) um surto de hepatite A que foi associado ao consumo de framboesas congeladas. Neste surto, cerca de 24 casos de hepatite A foram investigados por epidemiologistas e concluíram que os casos estavam relacionados. Todos os indivíduos afetados tinham estado num banquete servido num hotel da cidade, onde serviram musse de framboesas. Os investigadores concluíram que as framboesas foram provavelmente contaminadas no momento da sua colheita. (Reid & Robinson, 1987).

Foi igualmente reportado um surto de gastroenterite, em 1988, entre empregados numa indústria Finlandesa. As amostras fecais obtidas dos indivíduos que tinham ficado doentes simultaneamente sugeriram o molho de framboesas (elaborado com framboesas congeladas importadas) como a origem do surto de calcivirus (Pönkä, Maunula, von Bonsdorff, & Lyytikäinen, 2000).

Existe igualmente um estudo que documenta todos os surtos alimentares provocados por *Cyclospora* durante 18 anos (2000 a 2017) nos Estados Unidos da América. Dos 39 casos reportados apenas em 17 conseguiram identificar o veículo alimentar da infeção, sendo que dois foram associados ao consumo de framboesas. Estes dois surtos ocorreram em 2000 na Pensilvânia e em 2001 até 2002 em Vermont, tendo sido reportados um total de 76 indivíduos afetados (CDC, 2019).

Outro estudo documenta um surto de *Salmonella enterica* em sumo de framboesa, onde as framboesas foram previamente congeladas e importadas da União Europeia (on Biological Hazards (BIOHAZ), 2014).

1.4 Irradiação por feixe de elétrons e mecanismos de inativação microbiana

Sabe-se que vários agentes patogénicos adquirem cada vez mais resistência a tratamentos que utilizam antibióticos, químicos e calor como agentes de inativação microbiana (Prichard, 1997). No entanto, muitos dos agentes patogénicos presentes nos alimentos, incluindo bactérias e parasitas são relativamente sensíveis à radiação (J. Davies & Davies, 2010). O controlo da carga microbiana pela aplicação da radiação ionizante continua a ser uma aplicação fundamental das tecnologias de radiação, considerando o sucesso comercial da esterilização dos dispositivos médicos utilizando essa metodologia.

A irradiação por feixe de elétrons é um tratamento físico e isento de substâncias químicas, sendo por isso um processo amigo do ambiente. Este processo recorre a aceleradores de elétrons, que geram um feixe de elétrons energizado com capacidade de ionizar átomos e moléculas, e produzir radicais livres que reagem com moléculas. Esta tecnologia é considerada uma alternativa de tratamento para alimentos que não podem ser processados pelos métodos convencionais.

Quando a radiação ionizante é absorvida pelo material biológico, esta interage com alvos críticos na célula. As biomoléculas de maior dimensão, como o DNA, RNA e proteínas, podem ser ionizadas ou excitadas pela deposição direta de energia, fenómeno que é denominado efeito direto da radiação que dá origem a uma cascata de eventos que podem culminar na morte celular. O DNA é considerado o alvo mais crítico da radiação ionizante. Sabe-se que a radiação produz lesões no DNA, incluindo danos nas bases nucleotídicas, quebras simples e duplas no DNA. À medida que a dose de radiação ionizante aplicada aumenta a densidade linear dos danos nas bases e em cadeias simples aumenta, dando origem a quebras nas cadeias duplas. A dose de radiação absorvida é medida em gray (Gy) de acordo com o Sistema Internacional de Unidade ou em kilogray (kGy), sendo que um gray equivale à absorção de energia por quilograma joule (J/kg). Normalmente, as proteínas individuais estão presentes em maior quantidade que os genes correspondentes logo, o dano provocado pela radiação ionizante numa proteína não é considerado um evento letal, ao contrário do que acontece quando o alvo é o DNA. Todavia, é aceite que as proteínas, na hierarquia de macromoléculas, são o alvo mais importante afetado pela radiação ionizante. Um mecanismo de defesa contra a radiação ionizante identificado em bactérias radioresistentes foi a acumulação de complexos de manganês com iões superóxidos. Este complexo pode prevenir a produção de espécies reativas de oxigénio dependentes de ferro, permitindo assim a proteção das atividades enzimáticas necessárias para reparar o DNA. Em termos práticos, a perda da capacidade de formar colónias por células irradiadas quando cultivadas num meio nutritivo é maioritariamente assumido como o critério de dano induzido pela radiação ionizante. As células que perderam esta competência designam-se como inativadas ou não viáveis pela ação letal da radiação ionizante (Cabo Verde, 2018).

Outro alvo da radiação ionizante é a água que é a molécula mais abundante nas células. A interação entre a água e a radiação ionizante denomina-se radiólise da água, originando a formação de radicais livres, que são extremamente reativos. Os radicais formados, principalmente os elétrons dissolvidos, átomos de hidrogénio, radicais hidroxilos, moléculas de hidrogénio e peróxido de hidrogénio, podem reagir com o DNA e outros alvos críticos biológicos causando danos que podem ser letais. Estes efeitos são designados indiretos. (Arguelles-Arias, Craig, & Fickers, 2011).

1.5 Cinética de inativação microbiana

Quando uma suspensão de microrganismos é irradiada a doses crescentes de radiação ionizante, o número de unidades formadoras de colónias (UFC) depois de cada incremento de dose pode ser usado para construir uma curva de dose-sobrevivência. A determinação da inativação microbiana depende

predominantemente de métodos baseados em cultura, existindo uma relação direta entre a quantidade da dose absorvida pelo organismo e a fração de inativação. De modo a caracterizar os microrganismos pela sua sensibilidade à radiação, é usado o parâmetro D10, definido como a dose necessária para inativar 90% de uma população microbiana, ou a dose de irradiação necessária para produzir uma redução de um logaritmo decimal da população (ex.: 10^6 UFC/g \rightarrow 10^5 UFC/g). Quando a sobrevivência à radiação segue uma cinética exponencial e o valor de D10 pode ser obtido pela seguinte equação (Equação 1.1):

$$D10 = \text{dose de radiação} / \log_{10}(N_0 - N) \text{ - Equação 1.1}$$

Onde N_0 é o número inicial de microrganismos na suspensão irradiada, N é o número de organismos que sobreviveram à dose de radiação (Lind, 1947).

A curva de sobrevivência exponencial pode ser representada matematicamente pela equação 1.2:

$$\log N = -\frac{1}{D10} + \log N_0 \text{ - Equação 1.2}$$

As curvas de sobrevivência podem também apresentar uma forma curvilínea, onde é possível observar um ombro inicial (curvas convexas), uma cauda final (curvas côncavas) ou ambas (curvas sigmoidais). Nas curvas convexas, é observado um ombro a baixas doses de radiação e uma fase exponencial para as doses mais altas. O ombro é atribuído a múltiplos alvos e / ou determinados processos de reparação que são eficazes a baixas doses de radiação e tornam-se ineficazes quando irradiados a doses mais elevadas. As curvas côncavas podem ser devidas à heterogeneidade da sensibilidade da população microbiana à radiação. Ou seja, as células mais sensíveis são inativadas primeiro e as mais resistentes persistem até doses mais elevadas. As curvas sigmoidais podem ser interpretadas como uma combinação de curvas de sobrevivência convexas e côncavas (Casolari, 1981; CERF, 1977; R. Davies, Sinskey, & Botstein, 1973).

1.6 Legislação de alimentos irradiados na união europeia

A irradiação de alimentos é um processo reconhecido por diversas organizações internacionais como OMS (Organização Mundial de Saúde), FAO (Food and Agricultural Organization) e FDA (Food and Drugs Administration). A Comissão Europeia em 1988 propôs um esboço sobre a irradiação de alimentos que continha uma lista de 9 produtos ou grupos de produtos para os quais a irradiação iria ser permitida. Em 1999 foi publicado um relatório pela OMS onde citam que os alimentos irradiados são seguros para o consumidor e nutricionalmente adequados (OMS, 1999). A diretiva 1999/2/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Fevereiro de 1999 relativa à aproximação das legislações dos Estados-membros respeitantes aos alimentos e ingredientes alimentares tratados por radiação ionizante estabelece as condições de fabrico, comercialização, importação e rotulagem obrigatória de alimentos tratados por radiação ionizante, um processo que reduz o número de microrganismos patogénicos nos alimentos e aumenta o seu prazo de validade. Esta diretiva ficou aplicável desde 20 de março de 1999, sendo que os países da União EU tiveram de a transpor para o seu direito nacional até dia 20 de setembro de 2000 (no que diz respeito às regras de autorização da comercialização e utilização de alimentos irradiados) e dia 20 de março de 2001 (no que diz respeito às regras de proibição da comercialização e utilização de alimentos irradiados que não cumprem a diretiva).

O anexo da Diretiva 1999/3/CE, uma diretiva de execução, estabelece uma lista inicial de géneros alimentícios que podem ser tratados por radiações, nomeadamente, ervas aromáticas secas, especiarias e condimentos vegetais. Esta lista inicial é considerada provisória e vários estados membros possuem permissões nacionais para irradiar outros produtos como é o caso da Bélgica, França, Itália, Holanda e Reino Unido (EU, 2002; EU, 2003a)

Os géneros alimentícios só podem ser tratados por radiação ionizante em instalações aprovadas pelas autoridades dos países da União Europeia (UE), existindo uma lista aprovada de instalações publicada pela Comissão Europeia. Adicionalmente, a Decisão 2002/840/CE permite que os alimentos sejam tratados por radiação em países fora da UE e posteriormente importados na UE, desde que sejam cumpridas as regras da UE e que o tratamento seja realizado numa instalação aprovada e publicada.

Os alimentos tratados por radiação só podem ser colocados no mercado da UE se cumprirem a diretiva, que especifica as condições de autorização para a irradiação de alimentos (como a necessidade tecnológica e benefícios para o consumidor) e os objetivos (reduzir a o risco de doenças, libertar os alimentos de organismos prejudiciais); os alimentos devem estar num bom estado de salubridade e a irradiação não devem ser utilizada para substituir medidas de higiene; a irradiação pode utilizada em combinação com um tratamento químico, desde que esse tratamento não tenha o mesmo objetivo que a irradiação; as fontes de radiação ionizante (raios gama, raios X e eletrões com determinadas características); a dosimetria (a determinação da dose global média absorvida e os procedimentos utilizados para medir esse valor). A diretiva estabelece ainda que a dose máxima de radiação para os alimentos pode ser administrada em doses parciais.

A menção «produto irradiado» ou «produto tratado por radiação ionizante» deve estar indicada no rótulo ou na embalagem e nos documentos que acompanham os alimentos ou os alimentos que contêm ingredientes irradiados.

Os produtos destinados à venda ao consumidor final devem cumprir os requisitos estabelecidos pelo Regulamento (UE) n.º 1169/2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios. O processo de irradiação de alimento encontra-se regulamentado pela norma ISO 14470:2011, que é aplicada ao processamento, comercialização de alimentos e ingrediente alimentares, que devem ser rotulados com a seguinte frase “alimento tratado com radiação ionizante” apresentando igualmente o símbolo Radura (Figura 1.2).



Figura 1.2: Símbolo internacional de irradiação de alimentos – Radura - que foi aprovado para a rotulagem de qualquer alimento irradiado a ser comercializado.

1.7 Aplicações alimentares da tecnologia de irradiação por feixe de eletrões

A irradiação é uma medida de controlo. Por definição, uma medida de controlo é qualquer ação e atividade que possa ser usada para prevenir ou eliminar um risco de segurança alimentar ou reduzi-lo a um nível aceitável. Um critério de performance é o resultado exigido de uma ou mais medidas de

controle a uma etapa ou combinação de etapas que contribuem para assegurar a segurança dos alimentos. Quando se estabelece os critérios de performance, deve ser tomado em conta os níveis iniciais de risco e as suas alterações durante a produção, processamento e armazenamento. Considerando estes fatores, os critérios para eficácia microbiana podem contemplar uma redução da quantidade de microrganismos de 99.9% (3 log), 99.99% (4 log), 99.999% (5 log) ou 9.9999% (6 log). Esta redução na quantidade microbiana, a qual pode representar um microrganismo específico ou uma comunidade microbiana, é normalmente expressa em unidades log₁₀ (Cabo Verde, 2018).

Foi recomendada a irradiação de alimentos a doses inferiores a 1 kGy para aplicações de desinfecção (ex. especiarias, cereais e frutos secos), de modo a retardar a senescência e maturação de frutas e legumes. As doses de radiação entre 1 kGy e 10 kGy são consideradas adequadas para a redução da carga microbiana presente nos alimentos, prolongando o seu tempo de vida útil, sendo um processo utilizado nas especiarias em pó, grãos de café, frutas/vegetais, frutos do mar e aves de capoeira (OMS, 1999).

Por exemplo, um estudo demonstrou que a irradiação de frutos (morangos, damasco, ameixas, pêssegos, uvas, tâmaras, figos, maçãs, peras e amoras) a doses de radiação ionizante entre 1,5 e 3,5 kGy reduz significativamente a carga fúngica em relação a amostras não tratadas. Além disso, depois de 28 dias de armazenamento a temperaturas de refrigeração, a fruta não irradiada estava contaminada com elevadas concentrações de micotoxinas, comparativamente com as amostras irradiadas a 5 kGy, onde não foram detetadas micotoxinas (Aziz & Moussa, 2002). Outro trabalho sugeriu como tratamento pós colheita para framboesas uma dose de radiação de 1,5 kGy, tendo verificado que a irradiação à dose proposta não resultava num impacto significativo nos atributos sensoriais e de qualidade, com o efeito benéfico de reduzir a microbiota em 95%, e de aumentar o conteúdo fenólico e atividade antioxidante durante 7 dias de armazenamento em condições de refrigeração (Verde et al., 2013).

A irradiação como tratamento de descontaminação ainda não foi adotada em larga escala pela indústria dos produtos frescos. Este facto pode dever-se à necessidade de aumentar a investigação, de modo a avaliar a tolerância da maioria das frutas e vegetais às doses de irradiação necessárias para controlar uma variedade de microrganismos patogénicos (Goodburn & Wallace, 2013). Além disso, é necessária uma comunicação eficaz sobre o sucesso de marketing para a indústria e os benefícios para os consumidores para a aceitação desta tecnologia.

De facto, assegurar a segurança alimentar é especialmente importante para pessoas que têm o sistema imunitário comprometido. Os alimentos são uma fonte potencial de infeção e até microrganismos normalmente considerados não patogénicos podem causar problemas (Cabo Verde, 2018).

A irradiação por feixe de eletrões ou radiação gama representa um tratamento alternativo à temperatura (a autoclavagem reduz as propriedades organoléticas) para atingir dietas neutropénicas e, ao mesmo tempo, aumentar a variedade de alimentos disponíveis para estes pacientes, permitindo a introdução de alimentos que são normalmente considerados de alto risco devido à sua carga microbiana (Pryke & Taylor, 1995). Também são utilizados métodos de tratamento de alimentos por radiação ionizante para o desenvolvimento de alimentos para os programas espaciais (Yoon et al., 2011). Estes alimentos foram aprovados pela FDA em 1995 (FDA, 2018).

2. Problemática

As doenças transmitidas por alimentos, nomeadamente as que são causadas por microrganismos patogénicos, continuam a ser um problema de saúde pública a nível global. É estimado que 600 milhões de pessoas ficam doentes depois de comerem alimentos contaminados e que, dessas pessoas, 420 mil morrem todos os anos. As doenças diarreicas são as mais comuns, levando a que 550 milhões de pessoas fiquem doentes, resultando na morte de 230 mil pessoas todos os anos (OMS, 2019).

Os vegetais e frutas frescas são componentes importantes para uma dieta saudável e equilibrada. O seu consumo é encorajado em vários países pelas agências governamentais de saúde como proteção contra uma vasta gama de doenças, como o cancro e doenças cardiovasculares. No entanto, as frutas, vegetais são geralmente consumidos crus, sendo reconhecidos como um veículo importante de transmissão de agentes patogénicos humanos que estão normalmente associados a alimentos de origem animal. Atualmente existe um conhecimento limitado sobre onde ocorre a contaminação na cadeia de suprimentos ou sobre o mecanismo pelo qual os patógenos humanos colonizam e sobrevivem em frutas e vegetais (Berger et al., 2010).

Normalmente, as framboesas têm um tempo prateleira de cerca de 3 a 5 dias, sendo por isso considerado um alimento perecível. As bactérias mais frequentemente associadas a surtos gastrointestinais são *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (OMS, 2019). As doenças causadas por salmonela não tifoide são um sério problema de saúde pública com custos económicos elevados para várias partes do mundo. Segundo os dados divulgados pela Organização mundial de Saúde (OMS) sobre Doenças Transmitidas por Alimentos tem ocorrido um aumento global da incidência de salmonelose (Gomez, Motarjemi, Miyagawa, Käferstein, & Stöhr, 1997). Outro microrganismo associado frequentemente a surtos alimentares é *Listeria monocytogenes*, esta bactéria consegue crescer em temperaturas de refrigeração, sendo que é encontrada em laticínios não pasteurizados e em vários alimentos prontos a comer (OMS, 2019). A listeriose, tem uma taxa de mortalidade de 24% e afeta nomeadamente mulheres grávidas, os seus fetos e pessoas imunocomprometidas. Os sintomas são geralmente aborto, morte neonatal, septicémia e meningite (Farber & Peterkin, 1991). A bactéria *Escherichia coli* O157:H7 é reconhecida como agente patogénico cujo modo de transmissão são os alimentos. No entanto, pode também ocorrer a transmissão de indivíduo para indivíduo, especialmente em centros de dia e casas de cuidado de idosos. Os estudos realizados até agora indicam que o gado é um reservatório importante deste microrganismo (Padhye & Doyle, 1992). A infeção por esta bactéria pode causar diarreia, a síndrome hemolítico urémico ou púrpura trombocitopénica trombótica e morte.

Desta forma torna-se crucial desenvolver um processo de tratamento eficaz para o controlo de microrganismos nos alimentos, preservando também os seus atributos durante um período de tempo mais alargado, de modo a prevenir o desperdício alimentar e garantir a segurança alimentar.

A tecnologia de irradiação por feixe de eletrões é um tratamento que consiste na exposição dos alimentos a uma quantidade de radiação ionizante específica e controlada. Este processo de tratamento é correntemente utilizado no tratamento de mais de 60 géneros alimentícios em cerca de 50 países (Severino, 2018).

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a tecnologia de irradiação por feixe de eletrões como um tratamento pós-colheita, de modo a garantir a segurança e qualidade de framboesas, para as quais esta tecnologia ainda não tinha sido validada.

3. Objetivos

O principal objetivo deste estudo foi a avaliação da tecnologia de irradiação por feixe de elétrons como tratamento pós-colheita de framboesas, de forma a assegurar a segurança e qualidade desta fruta com uma potencial extensão do tempo de prateleira.

Os objetivos específicos do estudo foram:

1. Determinação da cinética de inativação por feixe de elétrons da população bacteriana e fúngica presente nas framboesas antes e após armazenamento refrigerado (3, 7 e 14 dias).
2. Caracterização da população bacteriana e fúngica presente nas framboesas antes e após o tratamento por feixe de elétrons durante o armazenamento refrigerado (3, 7 e 14 dias).
3. Estudo da inativação de microrganismos potencialmente patogênicos, tais como *Salmonella enterica* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, inoculados artificialmente nas framboesas antes e após o tratamento por feixe de elétrons e durante o armazenamento refrigerado (3, 7 e 14 dias).
4. Avaliação do conteúdo fenólico, atividade antioxidante e conteúdo em ácido ascórbico de extratos de framboesas tratadas por feixe de elétrons durante o armazenamento refrigerado (3, 7 e 14 dias) de forma a estimar a preservação das propriedades bioativas deste pequeno fruto após tratamento.
5. Proposta de uma dose de radiação por feixe de elétrons que garanta a segurança alimentar das framboesas e preserve as propriedades bioativas do alimento.

4. Materiais e Métodos

4.1 Irradiação das framboesas

As framboesas (*Rubus idaeus* L.) utilizadas neste estudo foram adquiridas em diferentes superfícies comerciais e mantidas a 3-4°C até serem analisadas.

As amostras de framboesas foram irradiadas num acelerador linear de elétrons (LINAC, GE Saturne 41) com uma energia de 10 MeV localizado no Campus Tecnológico e Nuclear do Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa (Bobadela, Portugal). As irradiações foram efetuadas à temperatura ambiente a um débito de dose 25 kGy/h e em triplicado para cada dose e para cada ensaio. As doses absorvidas foram estimadas através de dosímetros radiocrômicos calibrados FWT-60 (Far West Technology, Inc.).

Nos estudos de inativação da microbiota natural das framboesas, foram selecionadas caixas de framboesas com 125 g e as amostras foram irradiadas às doses de 1,5 kGy, 3 kGy e 5 kGy. Nos ensaios de inativação de microrganismos potencialmente patogénicos inoculados artificialmente, foram selecionadas amostras com 25 g de framboesas e colocadas em sacos estéreis de homogeneização (stomacher®) para serem irradiadas. As doses de radiação por feixe de elétrons utilizadas nos estudos com *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* foram 0,5 kGy, 1,5 kGy e 3 kGy e com *Listeria monocytogenes* foram 0,4 kGy, 0,8 kGy e 3 kGy.

Na avaliação da bioatividade das framboesas foram selecionadas amostras de 18 g de framboesas, irradiadas em sacos individuais à dose de 3 kGy. Como controlo foram utilizadas amostras de framboesa não irradiadas (0 kGy).

4.1 Estudo do efeito do armazenamento

Para cada ensaio foram estudados quatro tempos de análise, o tempo 0 (t_0) cuja análise foi efetuada logo após a irradiação, e três períodos de armazenamento refrigerado a 4°C após irradiação: 3 dias (t_3), 7 dias (t_7) e 14 dias (t_{14}).

4.3 Inativação da microbiota natural de framboesas

Após cada período de armazenamento, as amostras irradiadas e não irradiadas foram divididas assepticamente em 25 g para sacos de homogeneização estéreis, aos quais foi adicionado 100 ml de solução de lavagem [soro fisiológico (NaCl a 0,9%) com 0,1% de tween 80] e homogeneizadas no stomacher durante 15 minutos.

A quantificação da microbiota natural das framboesas foi efetuada por inoculação de diluições seriadas das soluções de lavagem em dois meios de cultura diferentes, *Trypticase Soy Agar* (TSA) para a quantificação da população bacteriana mesófila, e *Malt Extract Agar* (MEA) para a quantificação da população fúngica. Para cada diluição foram realizadas três réplicas. As placas inoculadas de TSA foram incubadas a 30°C e as de MEA a 28°C, sendo que as contagens foram realizadas durante sete dias de incubação. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colónias por grama de framboesa fresca (UFC/g).

4.4 Caracterização macroscópica, microscópica e identificação da microbiota natural de framboesas

Após sete dias de incubação, os isolados presentes nas placas inoculadas de TSA e MEA (para cada amostra irradiada com 1,5 kGy, 3 kGy, 5 kGy e controlo) foram caracterizados macroscopicamente, tendo em consideração a forma, cor, elevação e margem da colónia, e microscopicamente tendo em consideração a mobilidade, morfologia celular e produção de esporos.

Depois da caracterização, os isolados mais frequentes foram identificados sempre que possível através de galerias bioquímicas miniaturizadas Rapid ID system (Remel): RapID™ CB PLUS System; RapID™ ONE System; RapID™ STAPH PLUS System; RapID™ NF PLUS System. O procedimento foi realizado em conformidade com as instruções do fabricante. No entanto, para alguns isolados a identificação foi efetuada recorrendo a técnicas convencionais de bacteriologia com base no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

Após a caracterização macroscópica e microscópica das colónias fúngicas, os isolados mais frequentes identificados. As colónias fúngicas leveduriformes foram identificadas utilizando-se galerias bioquímicas miniaturizadas Rapid ID system (Remel): RapID™ YEAST system segundo as instruções do fabricante. As colónias fúngicas filamentosas foram identificadas microscopicamente segundo (Hoog, Guarro, Gené, & Fiqueras, 2002).

4.5 Inativação de microrganismos potencialmente patogénicos

Para este estudo foram utilizados três estirpes de bactérias potencialmente patogénicas: *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111). Estes microrganismos foram inoculados individualmente em amostras de 25 g de framboesas anteriormente desinfetadas com uma solução de etanol a 70%, sendo deixadas a secar numa camara de fluxo laminar. Este procedimento teve como objetivo eliminar a microbiota natural da framboesa de modo a quantificar apenas a inativação dos microrganismos inoculados artificialmente nas framboesas.

As amostras de framboesas foram inoculadas superficialmente com alíquotas das suspensões bacterianas preparadas em soro fisiológico (10^5 UFC/ml) de forma a obter aproximadamente 10^3 UFC por grama de framboesa fresca.

Após cada tempo de análise, a quantificação das bactérias sobreviventes foi efetuada segundo o procedimento descrito anteriormente para a microbiota natural, através de inoculações de diluições seriadas das soluções de lavagem em meio de cultura TSA. Para cada diluição foram realizadas três réplicas. As placas inoculadas de TSA foram incubadas a 37°C e as contagens foram realizadas durante sete dias de incubação. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colónias por grama de framboesa fresca (UFC/g).

4.6 Extração de compostos fenólicos

Após cada tempo de análise, as amostras de framboesas foram colocadas em sacos individuais e maceradas manualmente, e posteriormente liofilizadas durante 72 horas. A extração dos compostos fenólicos foi efetuada a partir 1 g de amostra liofilizada, utilizando-se como solvente de extração uma mistura etanol:água (80:20 v/v, 30 ml) e agitação durante 1h a 150 rpm. O sobrenadante foi filtrado com papel de filtro (Whatman C) para um balão de vidro de 100 ml e o restante resíduo foi novamente extraído com uma porção adicional de solvente (30 ml). De modo a remover o etanol, as soluções foram juntas e evaporadas num evaporador rotativo a 40°C sob baixa pressão (evaporador rotatório Büchi R-

210, Flawil, Switzerland). De maneira a obter extratos secos, a fração aquosa foi liofilizada e calculada a massa exata dos respetivos extratos para determinar o rendimento da extração. As amostras de extratos foram preparadas em triplicado.

4.7 Avaliação da atividade antioxidante

A análise dos extratos foi efetuada pelos seguintes métodos:

4.7.1 Free radical scavenging activity – DPPH

Depois do processo de extração, foram realizadas 8 soluções com diferentes concentrações de extrato, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125, 0,156 e 0,078 mg/ml. Numa placa de 96 poços foram colocadas 30 µl de cada solução preparada anteriormente e 270 µl de solução metanólica de DPPH a 6×10^{-5} M. Após 60 minutos de reação no escuro à temperatura ambiente foi lida a absorvância a 515 nm num leitor de microplacas (EZ Read 1200 Microplate Reader). O ensaio foi efetuado em triplicado. Os resultados foram expressos em IC₅₀ µg/ml correspondendo à concentração de extrato que origina 50% de atividade antioxidante (quanto menor o valor de IC₅₀ maior é a atividade antioxidante).

4.7.2 Ferric reducing antioxidant power – FRAP

Primeiramente, foi preparada a solução FRAP constituída por 20 ml de cloreto de ferro a 20 mM, 20 ml de 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine a 10 mM (TPTZ) e 200 ml de tampão de acetato, a mistura foi posteriormente aquecida num banho de água a 37°C.

Depois da preparação da solução anterior, foi pipetado 100 µl da solução de cada extrato a 1,25 mg/ml para um tubo ao qual foi adicionado 3 ml de solução FRAP. Deixou-se a incubar durante 30 min no escuro e foi lida a absorvância a 593 nm num espectrofotómetro (Shimadzu UV 1800). O ensaio foi efetuado em triplicado. Os resultados foram expressos em mmol de equivalentes de sulfato ferroso (FSE) por 100 g de peso seco de framboesas (ps).

4.8 Conteúdo de fenólicos totais

A 20 µl de solução de extrato a uma concentração de 5 mg/ml foi adicionado 1,58 ml de água ultra pura e 100 µl de reagente Folin-Ciocalteu. A mistura foi incubada durante 5 min à temperatura ambiente. Após este tempo, adicionou-se 300 µl de solução carbonato de sódio a 29%, deixando-se a incubar à temperatura ambiente durante 2h. A absorvância a 765 nm num espectrofotómetro (Shimadzu UV 1800). O ensaio foi efetuado em triplicado. Os resultados foram expressos em mmol de equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de peso seco de framboesas (ps).

4.9 Determinação do conteúdo em ácido ascórbico (vitamina C)

O conteúdo em ácido ascórbico é determinado através da cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Prominence CBM 20-A, Shimadzu, Japan) com um detetor UV-DAD utilizando uma coluna Kinetex C18 XB-C18 (5µm, 250 mm, 4,0 mm) e deteção a 245 nm. Os extratos liofilizados (cerca de 10 mg) foram dissolvidos em ácido metafosfórico a 4,5% (1 ml). Todas as amostras foram filtradas por um filtro de nylon de 0,45 µm antes da análise. A fase móvel foi 1,8 mM H₂SO₄ (pH=2,6) com um fluxo de 0,9 ml/min. A temperatura da coluna foi mantida a 35°C e o volume de injeção foi de 10 µl. O ensaio foi feito em triplicado. Para propósitos de quantificação, foi realizado um gráfico de

calibração sob as condições experimentais usadas. Os valores foram expressos em mg por 100g de peso seco de framboesas.

5. Resultados e discussão

5.1 Inativação e quantificação da microbiota natural de framboesas

A cinética de inativação microbiana por feixe de elétrons em framboesas foi estudada com o objetivo de avaliar a descontaminação microbiana e a potencial extensão do tempo de prateleira de forma a verificar a aplicabilidade da tecnologia como tratamento pós-colheita deste pequeno fruto. Foram estudados dois tipos de população microbiana, a população bacteriana mesófila e a população fúngica.

5.1.1 População bacteriana mesófila

O valor médio da carga bacteriana mesófila estimado inicialmente para as framboesas frescas foi de $4,3 \pm 0,2$ log UFC/g. O decréscimo máximo obtido para a carga bacteriana mesófila imediatamente após o tratamento por feixe de elétrons a 5 kGy foi de aproximadamente 4 log UFC/g. Após 3 dias de armazenamento refrigerado (t_3), o valor médio da população bacteriana foi de $4,6 \pm 0,1$ log UFC/g, obtendo-se após irradiação a 5 kGy um decréscimo máximo de 4 log UFC/g. O valor médio da carga bacteriana manteve-se a $4,6 \pm 0,3$ log UFC/g, após 7 dias de armazenamento refrigerado (t_7), tendo-se observado um decréscimo máximo desta população de 4 log UFC/g após irradiação a 5 kGy. Para as amostras de framboesas não tratadas e armazenadas durante 14 dias (t_{14}) a carga bacteriana aumentou verificando-se um valor médio de 7 ± 1 log UFC/g. Contudo, o tratamento por feixe de elétrons a 5 kGy permitiu obter um decréscimo máximo da população bacteriana mesófila de aproximadamente 4 log UFC/g após 14 dias de armazenamento refrigerado. (Figura 5.1)

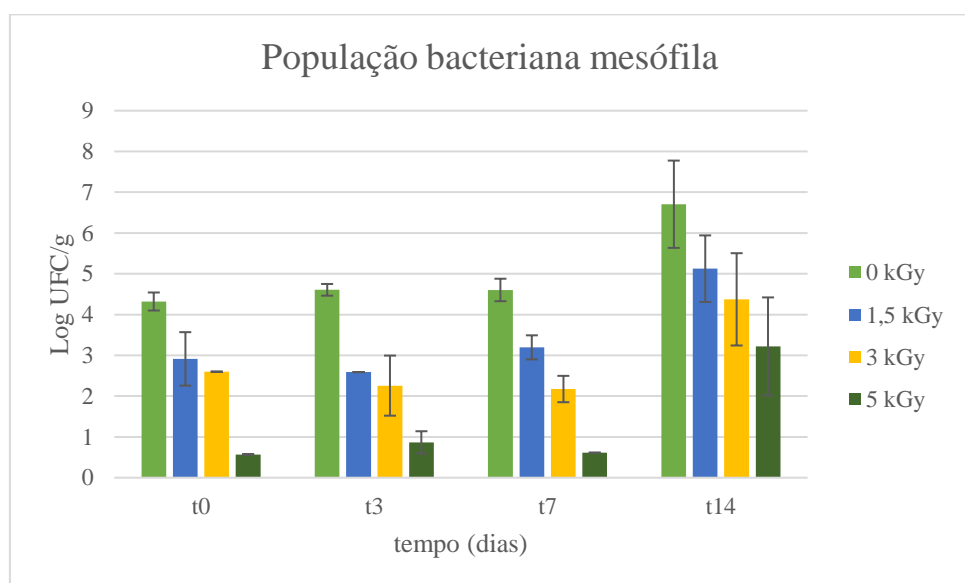


Figura 5.1: Sobrevivência da população bacteriana mesófila de framboesas tratadas por feixe de elétrons, logo após tratamento (t_0), após 3 dias (t_3), após 7 dias (t_7) e após 14 dias (t_{14}) de armazenamento refrigerado. As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança de 95% dos valores médios de log UFC/g ($n = 18$; $\alpha = 0,05$)

Num estudo efetuado anteriormente onde foi utilizada a radiação gama como processo de descontaminação pós-colheita de framboesas frescas, os resultados indicaram um valor médio da carga bacteriana mesófila de 4,9 log UFC/g para este pequeno fruto e uma redução logarítmica de 1 log UFC/g após irradiação a 1,5 kGy (Verde et al., 2013). Estes dados encontram-se em concordância com os resultados obtidos como se pode visualizar na Figura 5.1.

De uma forma geral, os resultados obtidos indicaram que o tratamento por feixe de elétrons reduz a carga bacteriana mesófila presente nas framboesas, e essa redução é mantida após o armazenamento refrigerado. Por exemplo, considerando o tratamento à dose de 3 kGy verificou-se um decréscimo de 2 log UFC/g da carga bacteriana mesófila, que se manteve após os 14 dias de armazenamento refrigerado.

5.1.2 População fúngica

Foi estimado o valor médio inicial de $6,1 \pm 0,2$ log UFC/g para a carga fúngica inicial das amostras de framboesas. O decréscimo máximo obtido para a carga fúngica imediatamente após o tratamento por feixe de elétrons a 5 kGy foi de 5 log UFC/g. Após 3 dias de armazenamento refrigerado (t_3), o valor médio da carga fúngica foi de $6,3 \pm 0,2$ log UFC/g, atingindo-se com a irradiação a 5 kGy um decréscimo máximo de 4 log UFC/g. A carga fúngica das framboesas não tratadas manteve-se ($6,3 \pm 0,3$) log UFC/g com o armazenamento refrigerado durante 7 dias (t_7), mas o decréscimo desta população após irradiação a 5 kGy e 7 dias armazenamento aumentou para 5 log UFC/g. Após 14 dias de armazenamento refrigerado (t_{14}), o valor médio da carga fúngica diminuiu para 5 ± 1 log UFC/g e o decréscimo máximo obtido para esta população após irradiação a 5 kGy (t_{14}) também diminuiu para 3 log UFC/g. (Figura 5.2)

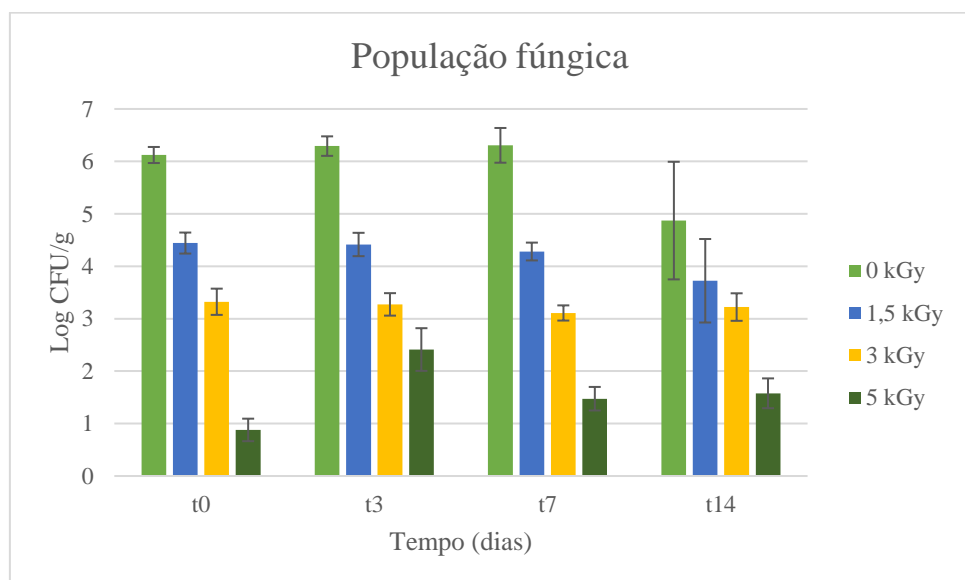


Figura 5.2: Sobrevivência da população fúngica de framboesas tratadas por feixe de elétrons, logo após tratamento (t_0), após 3 dias (t_3), após 7 dias (t_7) e após 14 dias (t_{14}) de armazenamento refrigerado. As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança de 95% dos valores médios de log UFC/g ($n = 18$; $\alpha = 0,05$)

À semelhança do observado para a população bacteriana mesófila, o tratamento pelo feixe de elétrons permitiu reduzir a carga fúngica das framboesas, diminuição essa que se manteve durante o armazenamento refrigerado.

5.2 Identificação da microbiota natural das framboesas

De forma a estudar a dinâmica de inativação microbiana com o tratamento por feixe de elétrons, a microbiota natural das framboesas foi caracterizada para as várias doses de radiação utilizadas após os vários tempos de armazenamento.

5.2.1 Bactérias mesófilas logo após tratamento (tempo 0)

A bactéria mais frequente (28%) nas framboesas não tratadas foi *Escherichia coli* (Figura 5.3). Esta bactéria está associada à morte de bebês, animais e a várias formas de gastroenterite (Roberts, Cowie, Abelson, Bolton, & Britten, 1995). Contudo, o tratamento por feixe de eletrões permitiu a sua inativação não sendo detetada a sua presença nas framboesas irradiadas.

Nas framboesas irradiadas às doses 1,5, 3 e 5 kGy a bactéria com maior frequência relativa foi *Micrococcus varians*. Esta bactéria está associada à deterioração de alimentos. *Micrococcus varians* está naturalmente presente na pele humana, no entanto, pode causar problemas de saúde em indivíduos com o sistema imunitário comprometido, idosos ou crianças (Bouillard, Michel, Dramaix, & Devleeschouwer, 2005). A presença desta bactéria na fruta pode estar associada ao processamento manual durante e após colheita.

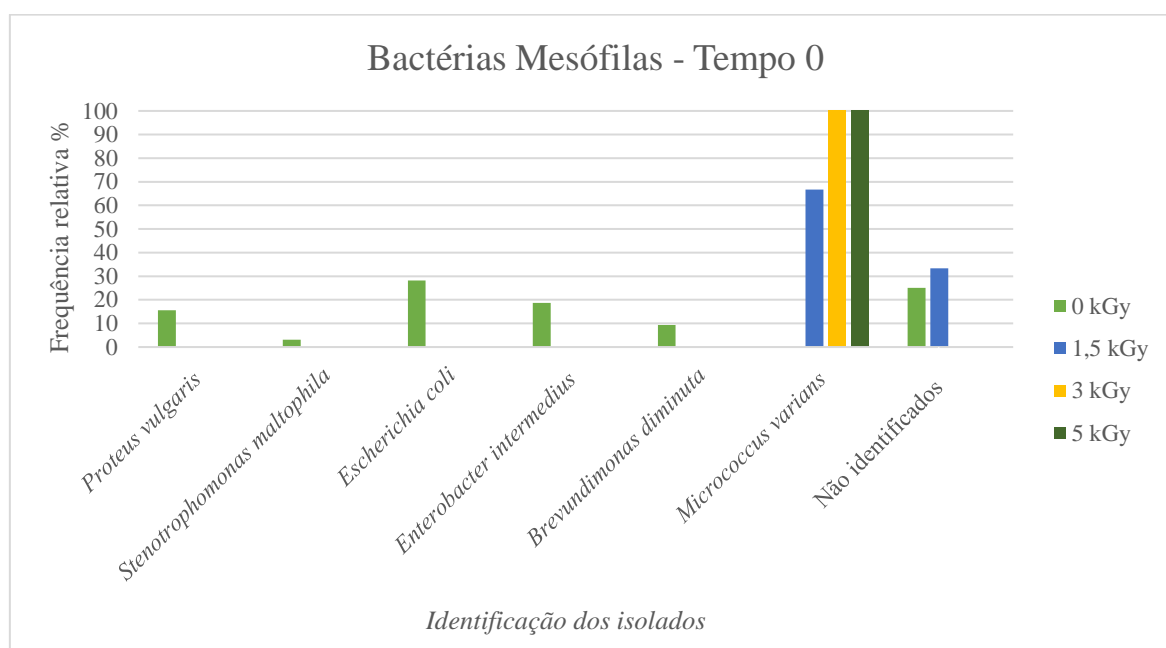


Figura 5.3: Bactérias mesófilas presentes nas framboesas não tratadas e logo após tratamento (t_0) a várias doses de radiação por feixe de eletrões. As frequências relativas dos isolados identificados estão apresentadas em percentagem.

A caracterização da microbiota das framboesas não tratadas e tratadas sem armazenamento indicou a diminuição da diversidade bacteriana com a irradiação por feixe de eletrões.

5.2.2 Bactérias mesófilas presentes 3 dias após tratamento (tempo3)

Nas framboesas armazenadas durante 3 dias (Figura 5.4), a bactéria com maior frequência relativa foi *Burkholderia cepacia* (54%). Esta bactéria está associada à patogenicidade da fibrose cística. Esta bactéria tem uma resistência inata a antibióticos, pelo que é difícil o seu tratamento, levando a um crescente número de mortes reportadas (Govan & Deretic, 1996). Todavia, a presença de *Burkholderia cepacia* não foi observada nas amostras tratadas por feixe de eletrões.

As framboesas irradiadas à dose de 1,5 kGy, indicaram a prevalência de *Staphylococcus epidermidis* (100%). Esta bactéria presente na pele tornou-se uma das causas de infeções nosocomiais (Vuong & Otto, 2002).

A bactéria com maior frequência relativa presente nas framboesas irradiadas a 3 kGy e armazenadas durante 3 dias foi *Bacillus marinus* (38%). Esta bactéria é normalmente encontrada em locais com acesso a ambientes marinhos. *Bacillus marinus* é reconhecido pela formação de metabolitos

secundários como ácidos gordos e polipéptidos. No entanto, não é considerado um agente patogénico humano, podendo contribuir para a degradação dos alimentos (Mondol, Shin, & Islam, 2013). Contudo, não foram isolados bactérias desta espécie nas amostras irradiadas a 5 kGy.

Para as framboesas irradiadas a 5 kGy e armazenadas 3 dias, foi detetada a maior frequência relativa de *Pseudomonas* spp. (29%), sendo que as bactérias deste género são reconhecidas como ubíquas.

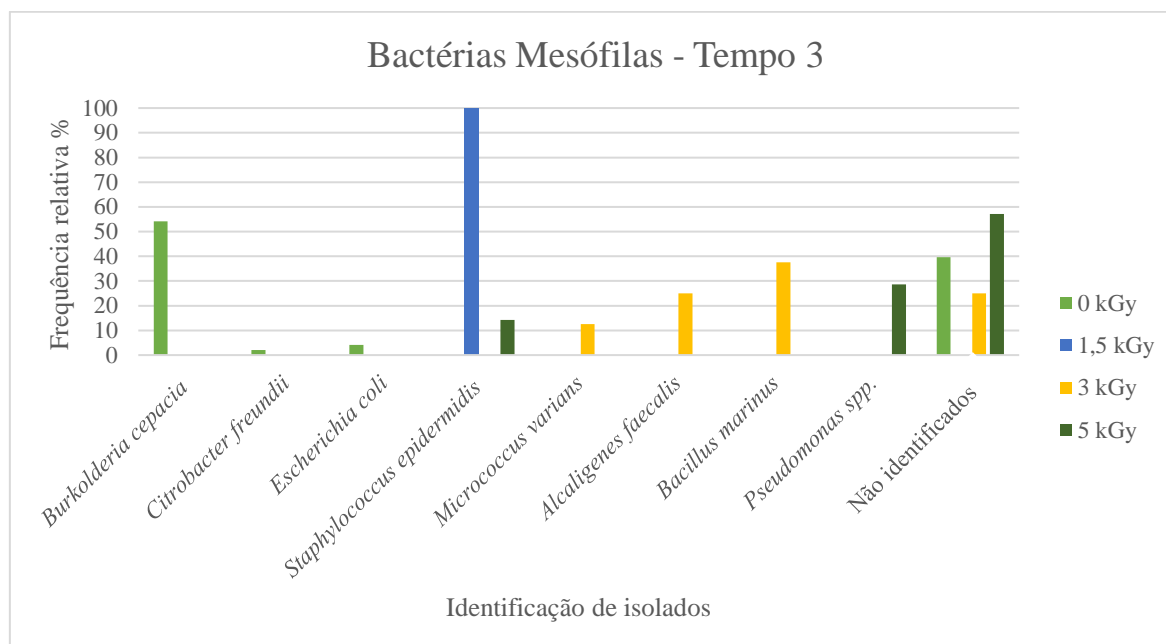


Figura 5.4: Bactérias mesófilas presentes nas framboesas não tratadas após 3 dias de armazenamento e 3 dias após tratamento (t_3) a várias doses de radiação por feixe de eletrões. As frequências relativas dos isolados identificados estão apresentadas em percentagem.

5.2.3 Bactérias mesófilas 7 dias após tratamento (tempo 7)

A população bacteriana das framboesas armazenadas durante 7 dias (Figura 5.5) indicou a maior frequência relativa de *Bacillus badius* (36%). Esta bactéria é normalmente encontrada em fezes, alimentos e fontes marinhas, não sendo considerado um agente patogénico humano, estando no entanto associado à degradação de alimentos (Ahmed, Othman, Sarwade, & Kachru, 2012). A presença desta bactéria não foi detetada nas frutas tratadas a 3 e 5 kGy e armazenadas 7 dias.

Para as framboesas irradiadas à dose de 1,5 kGy, foram detetadas como mais frequentes bactérias pertencentes ao género *Staphylococcus*.

Nas framboesas irradiadas a 3 kGy, a bactéria com maior frequência relativa detetada foi *Bacillus megaterium* (38%), também isolada nas frutas tratadas a 5 kGy (50%). Esta bactéria é utilizada para promover o crescimento das plantas e a diminuição das doenças nas plantas de chá (Chakraborty, Chakraborty, & Basnet, 2006). *Bacillus megaterium* não é considerado um agente patogénico humano, podendo causar a degradação dos alimentos.

Após o tratamento por feixe de eletrões a 5 kGy e 7 dias de armazenamento, as framboesas indicaram também a presença de *Staphylococcus warneri* (50%). Esta bactéria é um habitante normal da pele humana (Announ et al., 2004).

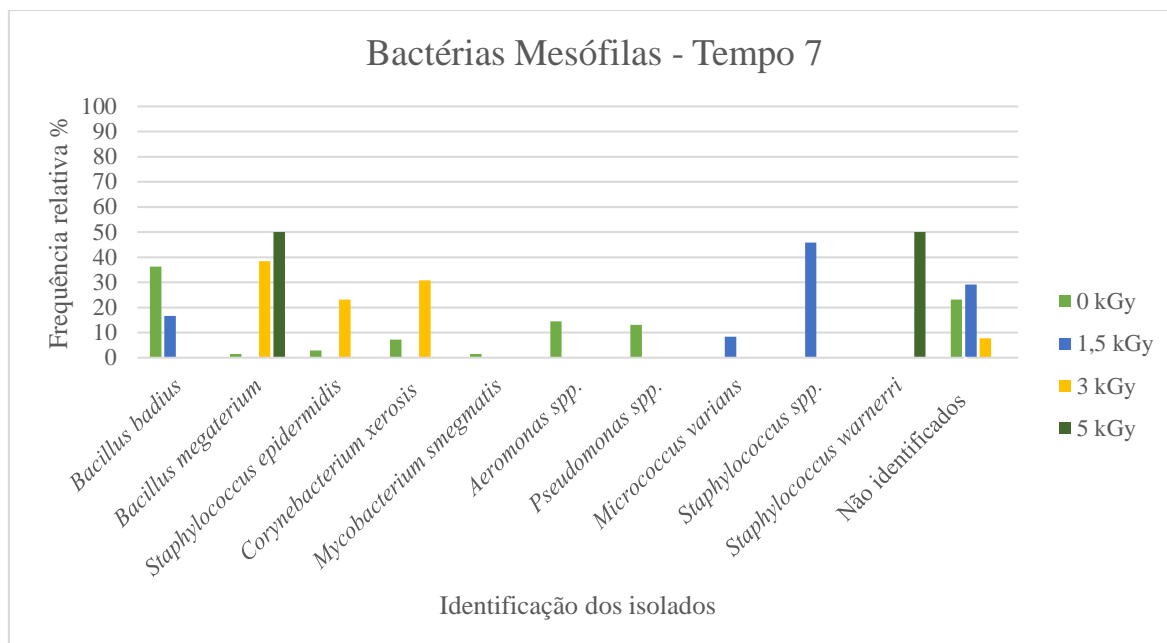


Figura 5.5: Bactérias mesófilas presentes nas framboesas não tratadas após 7 dias de armazenamento e 7 dias após tratamento (t₇) a várias doses de radiação por feixe de elétrons. As frequências relativas dos isolados identificados estão apresentadas em percentagem.

Estes resultados estão em concordância com os obtidos anteriormente, mostrando também uma diminuição da diversidade microbiana quando comparadas as amostras controlo com as amostras irradiadas.

5.2.4 Bactérias mesófilas presentes 14 dias após o tratamento (tempo 14)

Nas framboesas não tratadas e armazenadas durante 14 dias (Figura 5.6) foi detetada a presença de *Staphylococcus epidermidis* com maior frequência relativa (30 %).

O tratamento das framboesas por feixe de elétrons alterou a população bacteriana das frutas sobressaindo a presença de *Bacillus badius* a 1,5 kGy (frequência relativa de 55%), *Streptococcus mutans* a 3 kGy (frequência relativa de 11%), e *Bacillus marinus* a 5 kGy (frequência relativa de 78%).

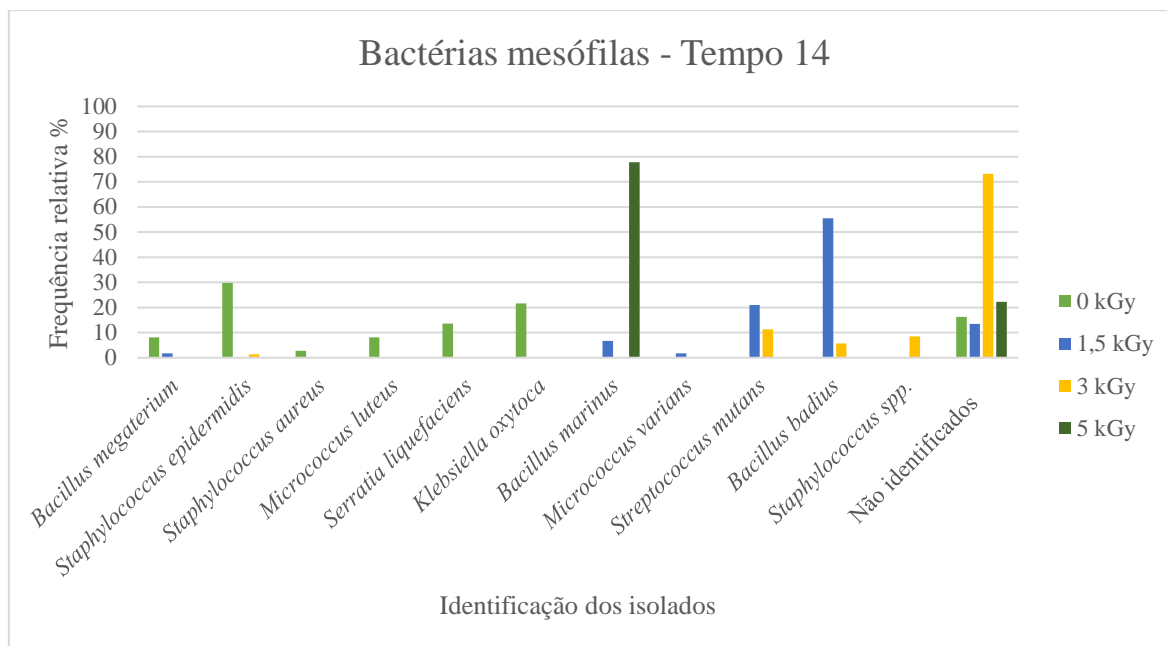


Figura 5.6: Bactérias mesófilas presentes nas framboesas não tratadas após 14 dias de armazenamento e 14 dias após tratamento (t_{14}) a várias doses de radiação por feixe de elétrons. As frequências relativas dos isolados identificados estão apresentadas em percentagem.

Estes resultados indicam que ocorreu um aumento ao longo do tempo de armazenamento da diversidade da população bacteriana, que foi diminuindo com o aumento da dose de radiação por feixe de elétrons.

5.2.5 Fungos filamentosos e leveduriformes logo após tratamento (tempo 0)

Para as amostras de framboesas não tratadas, o fungo detetado com maior frequência relativa (43%) foi *Cryptococcus neoformans* (Figura 5.7). Este fungo leveduriforme está associado à ocorrência de meningite em indivíduos com VIH (vírus de imunodeficiência humana) (Chuck & Sande, 1989). Contudo, esta levedura não foi isolada nas amostras de framboesas irradiadas, sugerindo a sua inativação após tratamento por feixe de elétrons.

Para as doses 1,5, 3 e 5 kGy, o fungo com maior frequência relativa foi *Hansenula wingei*. Como podemos observar na Figura 5.7, este fungo leveduriforme foi detetado em todas as amostras não irradiadas e irradiadas. Esta levedura é considerada por muitos investigadores um microrganismo favorável para o estudo da fisiologia do processo de fusão celular (Brock, 1961). Esta levedura não é considerada patogénica para os humanos, sendo que a sua presença em alimentos não cozinhados, como as framboesas, não deverá constituir um problema de saúde pública (Brookbank & Heisler, 1963).

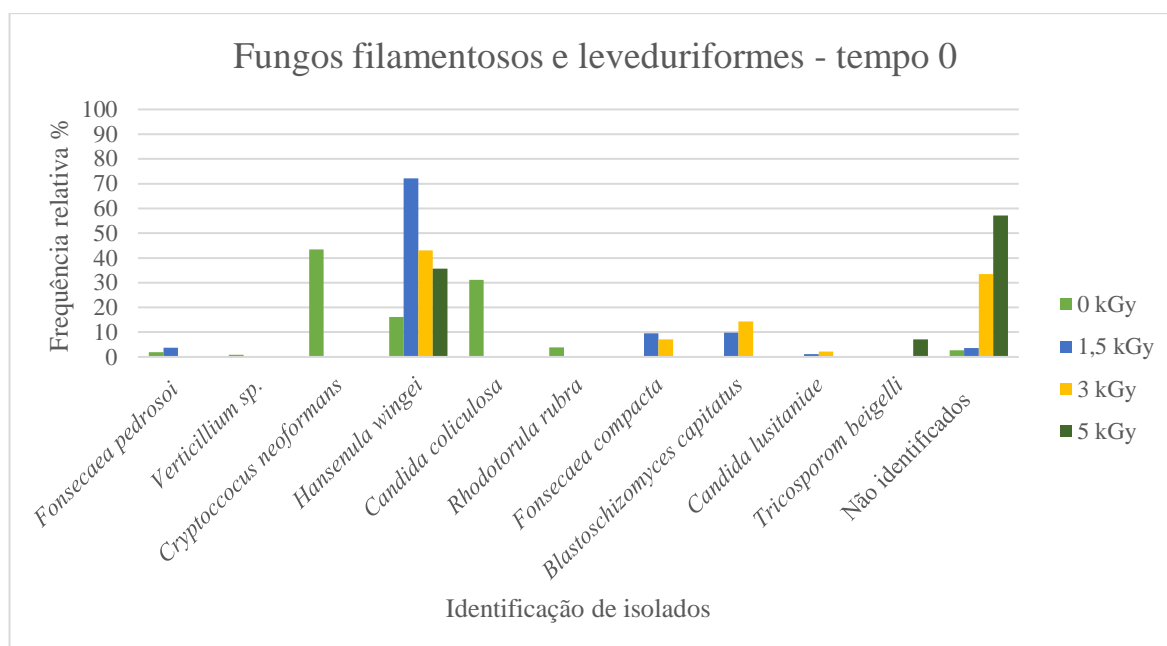


Figura 5.7: Fungos filamentosos e leveduriformes presentes nas framboesas não tratadas e logo após tratamento (t_0) a várias doses de radiação por feixe de elétrons. As frequências relativas dos isolados identificados estão apresentadas em percentagem.

Os resultados obtidos indicam o decréscimo da diversidade da população fúngica das framboesas com o tratamento por feixe de elétrons.

5.2.6 Fungos filamentosos e leveduriformes presentes 3 dias após tratamento (tempo 3)

A identificação da população fúngica das framboesas frescas armazenadas durante 3 dias (Figura 5.8) indicou a prevalência do fungo *Blastoschizomyces capitatus* (17%). Este fungo filamentoso, antes chamado de *Tricosporon capitatum* ou *Geotrichum capitatum*, foi associado a casos raros de doenças invasivas em indivíduos imunocomprometidos (Martino et al., 1990). Contudo, este fungo filamentoso não foi detetado nas amostras irradiadas a 5 kGy.

Para as framboesas irradiadas a 1,5 kGy, o fungo com maior frequência relativa foi *Chrysosporium* spp (6%), normalmente isolado de amostras de solo (Anstead, Sutton, & Graybill, 2012).

O fungo isolado com maior frequência relativa nas framboesas irradiadas a 3 e 5 kGy foi *Hansenula wingei*. Como mencionado anteriormente, esta levedura não é patogénica para humanos, podendo contribuir para a degradação da fruta.

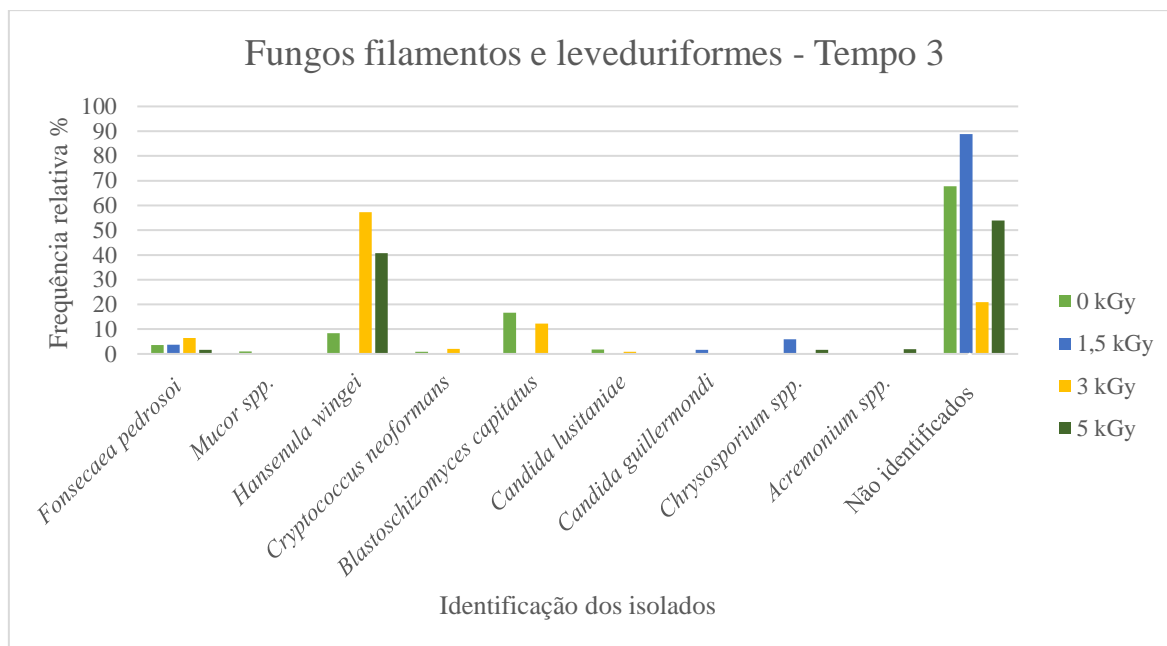


Figura 5.8: Fungos filamentosos e leveduriformes presentes nas framboesas não tratadas após 3 dias de armazenamento e 3 dias após tratamento (t_3) a várias doses de radiação por feixe de elétrons. As frequências relativas dos isolados identificados estão apresentadas em percentagem.

A diminuição da diversidade fúngica das framboesas com o tratamento por feixe de elétrons foi igualmente evidente após armazenamento refrigerado durante 3 dias, ressalvando-se a inativação de fungos considerados agentes patogénicos humanos oportunistas.

5.2.7 Fungos filamentosos e leveduriformes 7 dias após tratamento (tempo 7)

As framboesas armazenadas durante 7 dias (Figura 5.9) indicaram *Candida lusitanae* (37%) como sendo o fungo mais frequente. Este fungo leveduriforme tem baixa incidência de infeção em indivíduos imunocompetentes, no entanto está a emergir como agente patogénico oportunístico de indivíduos imunocomprometidos (Hadfield, Smith, Winn, Rinaldi, & Guerra, 1987). A presença desta levedura não foi detetada nas amostras tratadas por feixe de elétrons à dose de 5 kGy.

Nas framboesas tratadas com 1,5 kGy, o fungo com maior frequência relativa foi *Fonsecaea pedrosoi*, não sendo detetado nas frutas após irradiação a 5 kGy e armazenadas 7 dias. Este fungo filamentoso é o agente etiológico principal da doença cromoblastomicose, uma doença fúngica crónica que normalmente se encontra limitada a tecidos subcutâneos e de difícil tratamento (Santos et al., 2007).

As framboesas irradiadas a 3 kGy, indicaram a maior frequência relativa de *Hansenula wingei* (25%), também frequente na população fúngica das amostras não tratadas e irradiadas, com e sem armazenamento

Nas framboesas tratadas a dose 5 kGy, o fungo mais frequente foi *Fonsecaea compacta* (14%). Este fungo filamentoso é também um agente etiológico, mas não o principal, de cromoblastomicose (Ibrahim-Granet, Bievre, Romain, & Letoffe, 1985).

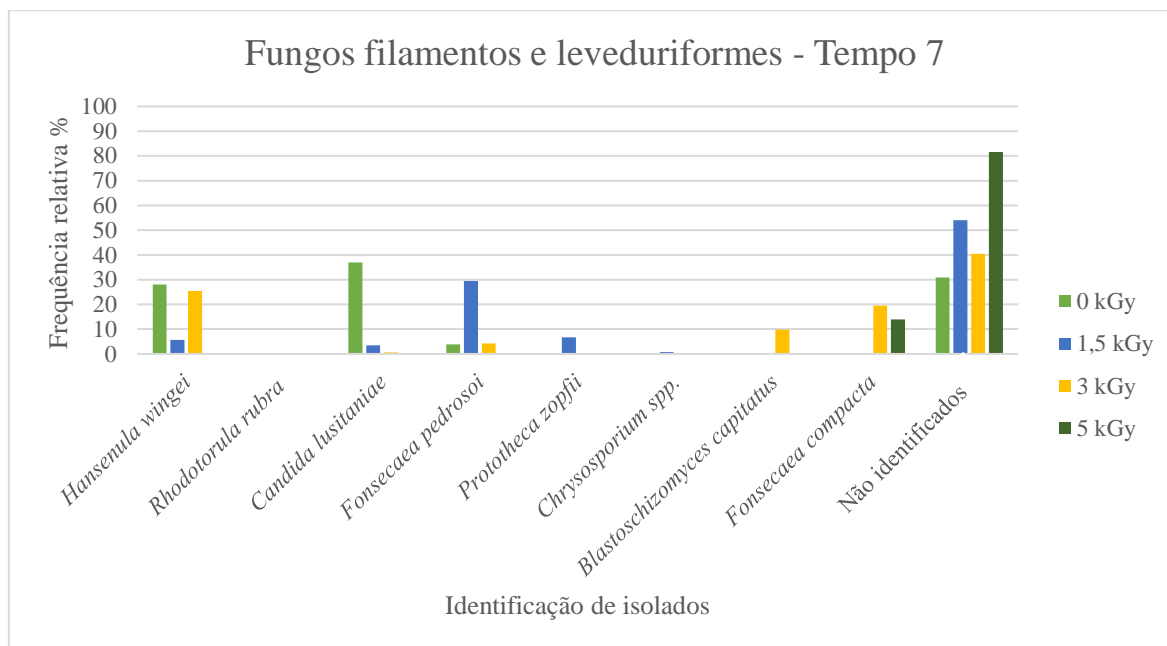


Figura 5.9: Fungos filamentosos e leveduriformes presentes nas framboesas não tratadas após 7 dias de armazenamento e 7 dias após tratamento (t_7) a várias doses de radiação por feixe de elétrons. As frequências relativas dos isolados identificados estão apresentadas em percentagem.

5.2.8 Fungos filamentosos e leveduriformes 14 dias após tratamento (tempo 14)

O fungo com maior frequência relativa detetado na população fúngica das framboesas não tratadas (38%) e irradiadas a 1,5 kGy (20%) e armazenadas durante 14 dias (Figura 5.10) foi *Candida lusitanae*, não sendo isolado nas amostras irradiadas a 3 e 5 kGy.

Para as frutas expostas a 3 e 5 kGy, o fungo com maior frequência relativa foi *Cryptococcus neoformans* (77% e 16%, respetivamente).

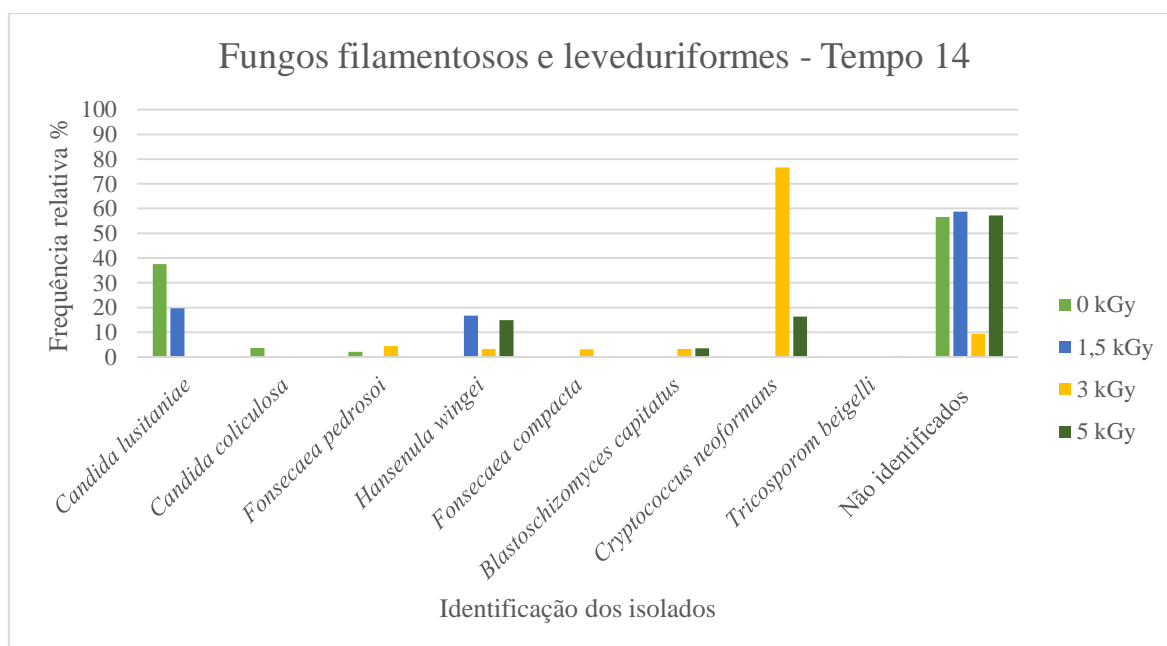


Figura 5.10: Fungos filamentosos e leveduriformes presentes nas framboesas não tratadas após 14 dias de armazenamento e 14 dias após tratamento (t_{14}) a várias doses de radiação por feixe de elétrons. As frequências relativas dos isolados identificados estão apresentadas em percentagem.

5.3 Inativação de microrganismos potencialmente patogénicos

Foi avaliada a tecnologia de irradiação por feixe de eletrões como tratamento de inativação de microrganismos potencialmente patogénicos que podem ocorrer em alimentos. As bactérias usadas foram *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* Typhimurium. De forma a avaliar a eficácia deste tratamento, estudou-se a cinética de inativação destes microrganismos potencialmente patogénicos antes e depois do armazenamento.

5.3.1 *Escherichia coli*

A qualidade microbiana da água de irrigação tem começado a ser considerada uma fonte de contaminação de frutas e vegetais. As fontes de água não tradicionais estão a ser usadas cada vez mais pelos agricultores em quintas pequenas na região meio-atlântico dos Estados Unidos da América, sendo que a bactéria *Escherichia coli* shiga-toxinogénica (ECST) tem sido considerada responsável por vários surtos de infeções associados ao consumo de vegetais de folhas verdes (Haymaker et al., 2019).

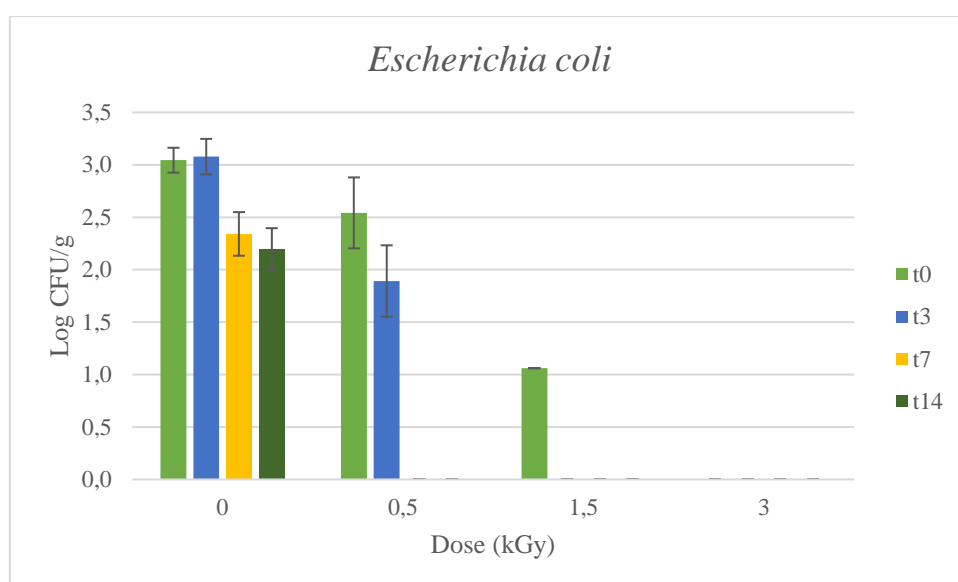


Figura 5.11: Sobrevivência de *Escherichia coli* inoculada artificialmente em framboesas tratadas por feixe de eletrões, logo após tratamento (t_0), após 3 dias (t_3), 7 dias (t_7) e 14 dias (t_{14}) de armazenamento refrigerado. As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança de 95% dos valores médios de log UFC/g ($n = 18$; $\alpha = 0,05$)

Os resultados obtidos na inativação de *E. coli* em framboesas por feixe de eletrões (Figura 5.11) indicaram um decréscimo da carga microbiana deste microrganismo com o aumento da dose de radiação e com o armazenamento, não sendo detetada a sua presença nas amostras irradiadas a 3 kGy. Após armazenamento refrigerado a 7 e 14 dias, apenas foi detetada a presença de *E. coli* nas amostras não tratadas, evidenciando a eficiência da irradiação por feixe de eletrões no controlo deste microrganismos. Para estes períodos de armazenamento foi igualmente observado nas amostras controlo uma diminuição de quase 1 log UFC/g na população de *E. coli*. Esta inativação poderá dever-se ao facto de as framboesas possuírem compostos bioativos que impedem a proliferação de certos microrganismos suscetíveis a estes efeitos. Num estudo, foi comprovado que muitas frutas em forma de baga, como as framboesas vermelhas, possuem taninos que possuem atividade antimicrobiana contra bactérias patogénicas (Heinonen, 2007).

Os resultados obtidos no presente trabalho indicaram uma maior eficiência na inativação de *E. coli* em framboesas (redução de 3 log UFC/g a 3 kGy) comparativamente com outros métodos de

tratamento físicos, nomeadamente a radiação UV. Um estudo anterior reportou uma redução logarítmica de 1,1 log UFC/g em framboesas inoculadas artificialmente com *E. coli* e tratadas à dose máxima de 10,5 kJ/m² (Adhikari, Syamaladevi, Killinger, & Sablani, 2015).

5.3.2 *Listeria monocytogenes*

Um outro agente patogénico cuja presença em alimentos frescos tem vindo a ser documentada é *Listeria monocytogenes*. Verificou-se que este microrganismo é capaz de crescer em vegetais embalados e armazenados em atmosfera modificada (García-Gimeno, Zurera-Cosano, & Amaro-López, 1996). Esta bactéria causa gastroenterite e pode originar bacteriemia e meningoencefalite em indivíduos com problemas na imunidade mediada por células, incluindo neonatos, mulheres grávidas, idosos e recetores imunossuprimidos de transplantes (Ooi & Lorber, 2005).

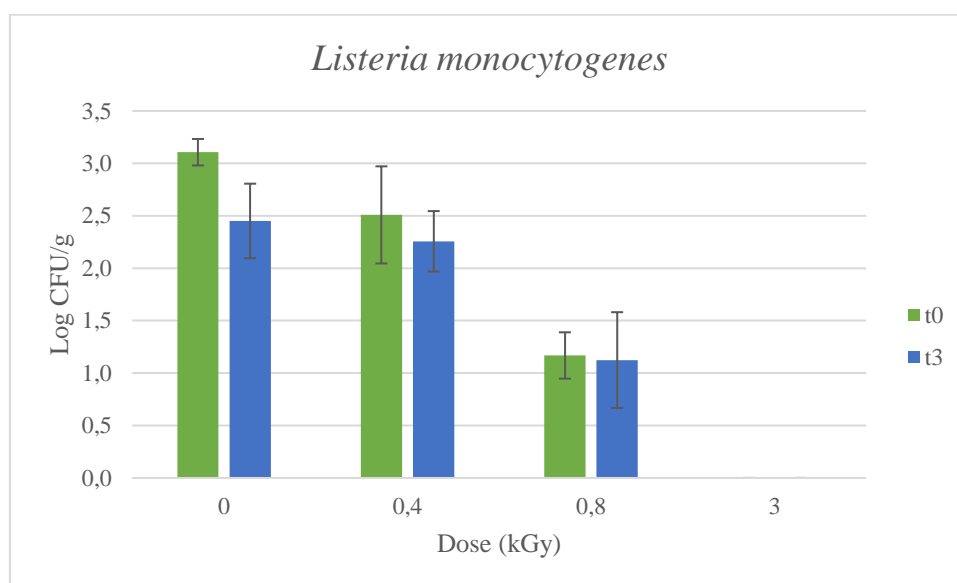


Figura 5.12: Sobrevivência de *Listeria monocytogenes* inoculada artificialmente em framboesas tratadas por feixe de eletrões, logo após tratamento (*t*₀), após 3 dias (*t*₃), 7 dias (*t*₇) e 14 dias (*t*₁₄) de armazenamento refrigerado. As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança de 95% dos valores médios de log UFC/g (*n* = 18; α = 0,05)

Os resultados da inativação de *L. monocytogenes* em framboesas estão apresentados na Figura 5.12, verificando-se que este microrganismo nas condições estudadas foi sensível ao armazenamento, não sendo detetado em nenhuma amostras de framboesas (não tratadas e tratadas) após 7 e 14 dias de armazenamento. Foi igualmente verificada uma maior radiosensibilidade de *L. monocytogenes*, pelo que foi necessário alterar a gama de doses de radiação por feixe de eletrões utilizada (comparativamente com o utilizado para *E. coli* e *S. Typhimurium*) para obter sobreviventes no estudo da cinética de inativação em framboesas. Desta forma, foi possível verificar que o tratamento por feixe de eletrões a 0,8 kGy permitiu atingir um decréscimo de 2 log UFC/g da população de *L. monocytogenes* logo após irradiação e 1 log UFC/g após 3 dias de armazenamento. Nas framboesas irradiadas a 3 kGy não foi detetada a presença desta bactéria.

Para outros métodos de desinfecção físicos, como a radiação UV, foi referido uma redução logarítmica de 1,1 log UFC/g de *L. monocytogenes* em framboesas irradiadas à dose máxima aplicada (11,9 kJ/m²) (Adhikari et al., 2015). Considerando os resultados obtidos após o tratamento à dose máxima aplicada de 3 kGy o feixe de eletrões demonstrou uma maior eficiência de desinfecção.

5.3.3 *Salmonella typhimurium*

Salmonella é uma das quatro principais causas globais de gastroenterite. A salmonelose é geralmente uma infecção autolimitada que apresenta sintomas como a diarreia, vômitos, dores abdominais e febre, mas infecções mais severas não são incomuns, levando a que cerca de 15000 pessoas sejam hospitalizadas e mais de 500 mortes ocorram anualmente. O trato intestinal dos animais é o principal reservatório de *Salmonella* não tifoide, podendo igualmente ocorrer a transmissão pessoa para pessoa. A transmissão de *Salmonella* a humanos ocorre tipicamente pela ingestão de produtos derivados do leite, alimentos contaminados por fezes de animais ou por contaminação cruzada. A transmissão zoonótica desta bactéria pode ocorrer pela exposição direta de fezes de répteis, animais de quinta, animais domésticos e outros animais (Wright et al., 2005).

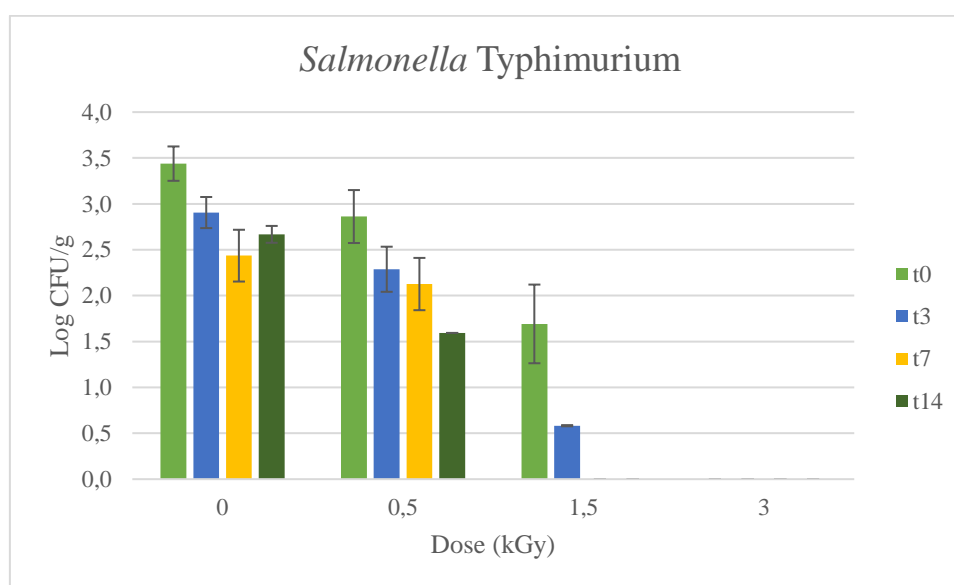


Figura 5.13: Sobrevivência de *Salmonella Typhimurium* inoculada artificialmente em framboesas tratadas por feixe de elétrons, logo após tratamento (t_0), após 3 dias (t_3), 7 dias (t_7) e 14 dias (t_{14}) de armazenamento refrigerado. As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança de 95% dos valores médios de log UFC/g ($n = 18$; $\alpha = 0,05$)

A população de *Salmonella Typhimurium* inoculada artificialmente nas framboesas indicou decrescer com aumento da dose de radiação por feixe de elétrons, e tal como para os outros agentes patogênicos estudados, não foi detectada a sua presença nas amostras tratadas a 3 kGy (Figura 5.13). Nas frutas frescas não tratadas, foi observado um decréscimo de aproximadamente 1 log UFC/g da população de *S. Typhimurium* com o armazenamento refrigerado de 14 dias. A irradiação das framboesas a 1,5 kGy diminuiu aproximadamente 2 log UFC/g a concentração de *Salmonella* logo após tratamento e depois de 3 dias de armazenamento, e a presença desta bactéria não foi verificada para os tempos de armazenamento de 7 e 14 dias.

A literatura existente tem reportado o estudo de tecnologias alternativas na desinfecção de *Salmonella* em pequenos frutos, tais como a luz pulsada, no entanto foi necessário combinar o tratamento com a adição de químicos para aumentar a sua eficiência (decrécimo máximo alcançado de 4 log UFC/g) (Huang, Sido, Huang, & Chen, 2015). No presente trabalho, o feixe de elétrons demonstrou ser um processo eficiente, e amigo do ambiente (sem adição de substâncias químicas), na inativação de *S. Typhimurium* em framboesas à dose de 3 kGy.

5.4 Avaliação dos efeitos do tratamento por feixe de elétrons no conteúdo bioativo das framboesas

Na avaliação de um processo de tratamento de alimentos, além de garantir a segurança alimentar é importante preservar a qualidade dos produtos a tratar. Tendo em conta a elevada bioatividade documentada para as framboesas, foram estimados os efeitos do processamento por feixe de elétrons no conteúdo fenólico, atividade antioxidante e teor em ácido ascórbico das framboesas frescas. Este estudo foi efetuado durante os vários períodos de armazenamento (0, 3, 7 e 14 dias) antes e após irradiação apenas a 3 kGy, selecionando-se esta dose por ter demonstrado garantir a segurança alimentar das framboesas.

5.4.1 Conteúdo fenólico e atividade antioxidante dos extratos de framboesa

Os compostos fenólicos são importantes pois contribuem para a qualidade nutricional e sensorial das frutas, oferecendo benefícios para a saúde devido ao seu potencial antioxidante (Shahbaz et al., 2014). Os resultados obtidos no conteúdo total de fenólicos e atividade antioxidante das framboesas antes e após irradiação e durante o tempo de armazenamento estão apresentados na Tabela 5.1. O valor obtido para o conteúdo total de fenólicos para as framboesas não tratadas foi 1092 ± 3 mg GAE/100g de peso seco, não se observando alterações com os tempos de armazenamento. A análise do conteúdo em fenólicos logo após o tratamento das framboesas por feixe de elétrons a 3 kGy sugeriu um aumento destes compostos (1405 ± 75 mg GAE/100g de peso seco), mas com o armazenamento o conteúdo manteve-se semelhante ao obtido para as amostras não tratadas. Os efeitos da radiação por feixe de elétrons nas propriedades bioativas das framboesas não se encontram documentados na literatura, contudo um estudo anterior cita o aumento do conteúdo fenólico durante o armazenamento em framboesas irradiadas por radiação gama a 2 kGy (Guimarães et al., 2013).

Tabela 5.1: Atividade antioxidante (atividade scavenging do DPPH e FRAP) e Conteúdo fenólico total nos extratos de framboesas não irradiadas e irradiadas analisadas imediatamente após a irradiação por feixe de elétrons e durante 14 dias de armazenamento refrigerado. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão.

Tempo de armazenamento (dias)	Dose (kGy)	DPPH atividade sca- venging (IC ₅₀ µg/mL)	FRAP (mmol FES/100g ps)	Conteúdo de fenólicos totais (GAE mg/100g ps)
0	0	2028 \pm 24 ^a	17.5 \pm 0.1 ^b	1092 \pm 3 ^b
	3	1964 \pm 39 ^a	13 \pm 1 ^c	1405 \pm 75 ^a
3	0	1698 \pm 17 ^b	17.2 \pm 0.1 ^b	1054 \pm 13 ^b
	3	1924 \pm 36 ^a	18.3 \pm 0.6 ^{a,b}	1012 \pm 87 ^b
7	0	1706 \pm 38 ^b	17.8 \pm 0.5 ^b	1078 \pm 5 ^b
	3	1651 \pm 24 ^b	18 \pm 1 ^{a,b}	1099 \pm 70 ^b
14	0	1201 \pm 12 ^d	21.3 \pm 0.1 ^a	1145 \pm 23 ^{a,b}
	3	1401 \pm 26 ^c	20.3 \pm 0.2 ^{a,b}	1067 \pm 59 ^b

Relativamente à atividade antioxidante, os resultados sugeriram diferentes tendências dependendo do método utilizado. A capacidade antioxidante medida pelo método DPPH indicou a preservação desta propriedade logo após irradiação e o seu aumento com o armazenamento. Por sua vez através do método FRAP, verificou-se um ligeiro decréscimo da atividade antioxidante dos extratos de framboesas logo após irradiação, que após armazenamento foi preservada.

De uma forma geral, os resultados parecem indicar a preservação do conteúdo fenólico e atividade antioxidante das framboesas irradiadas a uma dose de 3 kGy durante o armazenamento a 4°C.

5.4.2 Conteúdo em ácido ascórbico (vitamina C)

O ácido ascórbico, quando comparado a outros nutrientes, é um nutriente importante e sensível à degradação devido à sua oxidação durante o processamento e armazenamento de alimentos (Bauernfeind & Pinkert, 1970).

A quantidade de ácido ascórbico nas framboesas não tratadas foi de 124 ± 5 mg/100g de peso seco (Figura 5.14), verificando-se uma diminuição com o armazenamento que se manteve ao longo dos 14 dias de refrigeração. Porém, imediatamente após a irradiação (tempo 0), ocorreu uma diminuição significativa no conteúdo em ácido ascórbico, sugerindo um efeito radiolítico.

Esta tendência de decréscimo do conteúdo em ácido ascórbico nos extratos das framboesas irradiada foi-se acentuando com o aumento do tempo de armazenamento, apontando para um efeito combinado da irradiação e armazenamento na degradação desta vitamina nas framboesas. Para tentar mitigar este efeito poderão ser estudadas outras temperaturas de armazenamento.

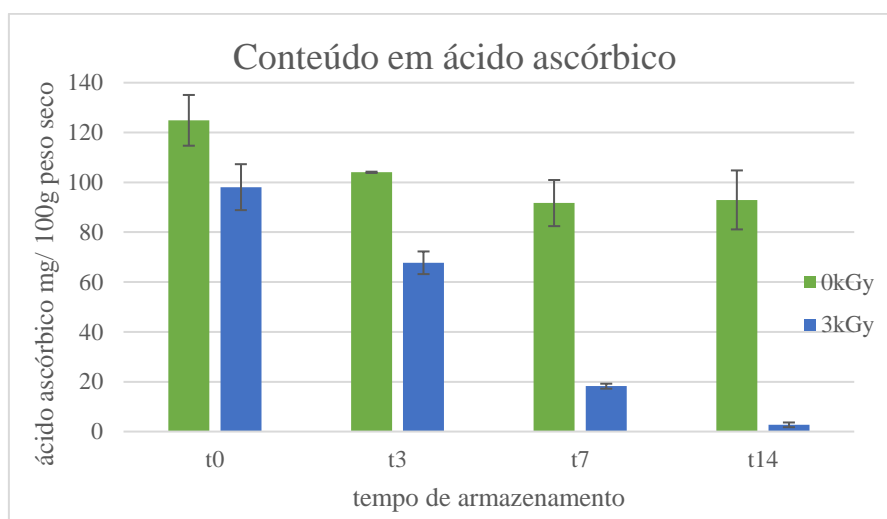


Figura 5.14: Efeito da radiação por feixe de elétrons no conteúdo em ácido ascórbico (mg/100g de peso seco) das framboesas durante armazenamento. As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança de 95% dos valores médios ácido ascórbico mg/100g de peso seco ($n = 6$; $\alpha = 0,05$)

6. Conclusão

Os resultados obtidos nos ensaios de inativação da população bacteriana mesófila natural das framboesas indicaram uma diminuição de aproximadamente 2 log UFC/g nas frutas tratadas por feixe de elétrons a 3 kGy. Esta redução corresponde a uma eficiência de inativação de 99% da microbiota bacteriana presente nas framboesas. Estes resultados mantiveram-se inalterados após 7 dias de armazenamento refrigerado a 4°C. Para a população fúngica, os resultados indicaram uma redução de 3 log UFC/g para as framboesas irradiadas à dose 3 kGy. Este decréscimo, que se manteve durante 7 dias de armazenamento refrigerado a 4°C, traduz-se numa eficiência de inativação de 99,9% da microbiota fúngica presente nas framboesas. O tratamento por feixe de elétrons à dose de 3 kGy indicou ser eficiente na descontaminação pós-colheita das framboesas, sugerindo um potencial aumento do tempo de prateleira deste fruto até 7 dias.

A caracterização da microbiota das framboesas indicou uma população diversa com predominância de leveduras e bactérias Gram negativas, possivelmente provenientes do solo, água da rega, e manipulação humana durante processamento das frutas. De uma forma geral foi observada a diminuição da diversidade microbiana com a irradiação por feixe de elétrons.

Nos ensaios de inativação de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* Typhimurium por feixe de elétrons em framboesas inoculadas verificou-se a inativação destas bactérias à dose de 3 kGy, validando a potencialidade desta tecnologia no controlo de microrganismos potencialmente patogénicos.

A avaliação da bioatividade das framboesas após o tratamento por feixe de elétrons apontou para a preservação do conteúdo fenólico e da atividade antioxidante nas framboesas irradiadas à dose de 3 kGy e armazenadas durante 7 dias a 4°C. Relativamente ao conteúdo em ácido ascórbico, observou-se uma diminuição acentuada ao longo do tempo de armazenamento da concentração desta vitamina nas framboesas irradiadas. Este facto sugere a degradação deste composto pelo tratamento por feixe de elétrons, devendo ser detalhado futuramente o mecanismo radiolítico de degradação de forma a minimizar a sua perda no processamento das framboesas.

Concluindo, os resultados obtidos sugerem que a segurança alimentar das framboesas pode ser assegurada pela utilização da irradiação por feixe de elétrons à dose de 3 kGy, como tratamento pós-colheita, com uma potencial extensão do seu tempo de prateleira até 7 dias.

7. Bibliografia

- Adhikari, A., Syamaladevi, R. M., Killinger, K., & Sablani, S. S. (2015). Ultraviolet-C light inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on organic fruit surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 136–142. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.018>
- Ahmed, A. T., Othman, M. A., Sarwade, V. D., & Kachru, G. R. (2012). Degradation of anthracene by alkaliphilic bacteria *Bacillus badius*. *Environment and Pollution*, 1(2), 97–104. Retrieved from <http://www.ccsenet.org/journal/index.php/ep/article/view/14508>
- Ahuja, J. K. C., Haytowitz, D. B., Pehrsson, P. R., Roseland, J., Exler, J., Khan, M., ... Mille, C. (2013). Composition of Foods Raw , Processed , Prepared USDA National Nutrient Database for Standard Reference , Release 27 Documentation and User Guide. *U.S. Department of Agriculture Agricultural Research Service Beltsville Human Nutrition Research Center Nutrient Data Laboratory*, 2(November), 1–136.
- Announ, N., Mattei, J. P., Jaoua, S., Fenollar, F., Sati, H., Chagnaud, C., ... Guis, S. (2004). Multifocal discitis caused by *Staphylococcus warneri*. *Joint Bone Spine*, 71(3), 240–242. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1297-319X\(03\)00126-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1297-319X(03)00126-X)
- Anstead, G. M., Sutton, D. A., & Graybill, J. R. (2012). *Adiaspiromycosis* Causing Respiratory Failure and a Review of Human Infections Due to *Emmonsia* and *Chrysosporium* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1346–1354. <https://doi.org/10.1128/JCM.00226-11>
- Arguelles-Arias, A., Craig, M. C., & Fickers, P. (2011). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances: Gram-positive antibiotic biosynthesis cluster: a review.*
- Aziz, N. H., & Moussa, L. A. A. (2002). Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. *Food Control*, 13(4), 281–288. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(02\)00028-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0956-7135(02)00028-2)
- Bauernfeind, J. C., & Pinkert, D. M. (1970). *Food Processing with Added Ascorbic Acid* (C. O. Chichester, E. M. Mrak, & G. F. Stewart, Eds.). In (pp. 219–315). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60371-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60371-7)
- Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P., & Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, 12(9), 2385–2397. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x>
- Boeing, H., Bechthold, A., Bub, A., Ellinger, S., Haller, D., Kroke, A., ... Watzl, B. (2012). Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *European Journal of Nutrition*, 51(6), 637–663. <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0380-y>
- Bouillard, L., Michel, O., Dramaix, M., & Devleeschouwer, M. (2005). Bacterial contamination of indoor air, surfaces, and settled dust, and related dust endotoxin concentrations in healthy office

- buildings. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 12(2), 187–192. Retrieved from <http://www.aaem.pl/BACTERIAL-CONTAMINATION-OF-INDOOR-AIR-SURFACES-AND-SETTLED-DUST-AND-RELATED-DUST,90241,0,2.html>
- Brock, T. D. (1961). Physiology of the Conjugation Process in the Yeast *Hansenula wingei*. *Microbiology*, 26(3), 487–497. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00221287-26-3-487>
- Brookbank, J. W., & Heisler, M. R. (1963). Immunology of the yeast *Hansenula wingei*. *Journal of Bacteriology*, 85(3), 509–515. Retrieved from <https://jb.asm.org/content/85/3/509>
- Cabo Verde, S. (2018). Food irradiation as Sanitary Treatment. In *Food Irradiation Technologies: Concepts, Applications and Outcomes* (pp. 190–192).
- Casolari, A. (1981). A model describing microbial inactivation and growth kinetics. *Journal of Theoretical Biology*, 88(1), 1–34. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-5193\(81\)90326-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-5193(81)90326-X)
- CDC. (2019). U.S. Foodborne Outbreaks of Cyclosporiasis—2000–2017. Retrieved from U.S. Foodborne Outbreaks of Cyclosporiasis—2000–2017 website: <https://www.cdc.gov/parasites/cyclosporiasis/outbreaks/foodborneoutbreaks.html>
- CERF, O. (1977). A REVIEW Tailing of Survival Curves of Bacterial Spores. *Journal of Applied Bacteriology*, 42(1), 1–19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1977.tb00665.x>
- Chakraborty, U., Chakraborty, B., & Basnet, M. (2006). Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*. *Journal of Basic Microbiology*, 46(3), 186–195. <https://doi.org/10.1002/jobm.200510050>
- Chuck, S. L., & Sande, M. A. (1989). Infections with *Cryptococcus neoformans* in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 321(12), 794–799. <https://doi.org/10.1056/NEJM198909213211205>
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 74(3), 417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- Davies, R., Sinskey, A. J., & Botstein, D. (1973). Deoxyribonucleic Acid Repair in a Highly Radiation-Resistant Strain of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 114(1), 357–366. Retrieved from <https://jb.asm.org/content/114/1/357>
- Farber, J. M., & Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 55(3), 476–511. Retrieved from <https://mmb.asm.org/content/55/3/476>
- FDA. (2018). CFR - Code of Federal Regulations Title 21. Retrieved from <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm>
- García-Gimeno, R. M., Guerra-Cosano, G., & Amaro-López, M. (1996). Incidence, survival and growth of *Listeria monocytogenes* in ready-to-use mixed vegetable salads in Spain. *Journal of Food Safety*, 16(1), 75–86. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1996.tb00152.x>
- Gomez, T. M., Motarjemi, Y., Miyagawa, S., Käferstein, F. K., & Stöhr, K. (1997). Foodborne salmonellosis. *World Health Statistics Quarterly. Rapport Trimestriel de Statistiques Sanitaires*

- Mondiales*, 50(1–2), 81—89. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/9282390>
- Goodburn, C., & Wallace, C. A. (2013). The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review. *Food Control*, 32(2), 418–427. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.012>
- Govan, J. R., & Deretic, V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 60(3), 539–574. Retrieved from <https://mmbr.asm.org/content/60/3/539>
- Guimarães, I. C., Menezes, E. G. T., Abreu, P. S. de, Rodrigues, A. C., Borges, P. R. S., Batista, L. R., ... Lima, L. C. de O. (2013). Physicochemical and microbiological quality of raspberries (*Rubus idaeus*) treated with different doses of gamma irradiation. *Food Science and Technology*, 33, 316–322. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612013000200016&nrm=iso
- Hadfield, T. L., Smith, M. B., Winn, R. E., Rinaldi, M. G., & Guerra, C. (1987). Mycoses Caused by *Candida lusitanae*. *Clinical Infectious Diseases*, 9(5), 1006–1012. <https://doi.org/10.1093/clinids/9.5.1006>
- Havas, S., Heimendinger, J., Reynolds, K., Baranowski, T., Nicklas, T. A., Bishop, D., ... Damron, D. (1994). 5 a day for better health: A new research initiative. *Journal of the American Dietetic Association*, 94(1), 32–36. [https://doi.org/10.1016/0002-8223\(94\)92037-0](https://doi.org/10.1016/0002-8223(94)92037-0)
- Haymaker, J., Sharma, M., Parveen, S., Hashem, F., May, E. B., Handy, E. T., ... Sapkota, A. R. (2019). Prevalence of Shiga-toxigenic and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in untreated surface water and reclaimed water in the Mid-Atlantic U.S. *Environmental Research*, 172, 630–636. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.02.019>
- Heinonen, M. (2007). Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics – a Finnish perspective. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(6), 684–691. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700006>
- Hoog, D. C., Guarro, J., Gené, G., & Fiqueras, M. (2002). *Atlas of Clinical Fungi* (2nd ed.). Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Huang, Y., Sido, R., Huang, R., & Chen, H. (2015). Application of water-assisted pulsed light treatment to decontaminate raspberries and blueberries from *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*, 208, 43–50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.016>
- Ibrahim-Granet, O., Bievre, C. De, Romain, F., & Letoffe, S. (1985). Comparative electrophoresis, isoelectric focusing and numerical taxonomy of some isolates of *Fonsecaea pedrosoi* and allied fungi. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 23(4), 253–264. <https://doi.org/10.1080/00362178585380381>
- J Nieuwenhuijsen, M. (2000). Nieuwenhuijsen MJ Toledano MB Eaton NE Fawell J and Elliott P, Chlorine disinfection by-products in water and their association with adverse reproductive outcomes: a review. *J Occup Environ Med* 57: 73-85. *Occupational and Environmental Medicine*,

- 57, 73–85. <https://doi.org/10.1136/oem.57.2.73>
- Kafkas, E., Özgen, M., Özoğul, Y., & Türemiş, N. (2008). Phytochemical and fatty acid profile of selected red raspberry cultivars: a comparative study. *Journal of Food Quality*, 31(1), 67–78. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2007.00184.x>
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., & Heinonen, M. (2001). Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 4076–4082. <https://doi.org/10.1021/jf010152t>
- Lind, S. C. (1947). Actions of Radiations on Living Cells. By D. E. Lea. *The Journal of Physical and Colloid Chemistry*, 51(6), 1451. <https://doi.org/10.1021/j150456a021>
- Martino, P., Venditti, M., Micozzi, A., Morace, G., Polonelli, L., Mantovani, M. P., ... Mandelli, F. (1990). Blastoschizomyces capitatus: An Emerging Cause of Invasive Fungal Disease in Leukemia Patients. *Clinical Infectious Diseases*, 12(4), 570–582. <https://doi.org/10.1093/clinids/12.4.570>
- Milutinović, M. D., Nikolić, M., Milivojević, J., Milutinović, M. M., & Daković, G. (2008). Growing primocane raspberry cultivars in Serbia. *Acta Horticulturae*, 777, 443–446. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.777.67>
- Mondol, M. A. M., Shin, H. J., & Islam, M. T. (2013). Diversity of Secondary Metabolites from Marine Bacillus Species: Chemistry and Biological Activity. *Marine Drugs*, 11(8), 2846–2872. <https://doi.org/10.3390/md11082846>
- OMS. (2019). Food safety. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- on Biological Hazards (BIOHAZ), E. P. (2014). Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (Salmonella and Norovirus in berries). *EFSA Journal*, 12(6), 3706. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3706>
- Ooi, S. T., & Lorber, B. (2005). Gastroenteritis Due to Listeria monocytogenes. *Clinical Infectious Diseases*, 40(9), 1327–1332. <https://doi.org/10.1086/429324>
- PADHYE, N. V., & DOYLE, M. P. (1992). Escherichia coli O157:H7: Epidemiology, Pathogenesis, and Methods for Detection in Food. *Journal of Food Protection*, 55(7), 555–565. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-55.7.555>
- Parry, J., Su, L., Luther, M., Zhou, K., Yurawecz, M. P., Whittaker, P., & Yu, L. (2005). Fatty Acid Composition and Antioxidant Properties of Cold-Pressed Marionberry, Boysenberry, Red Raspberry, and Blueberry Seed Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 566–573. <https://doi.org/10.1021/jf048615t>
- Pönkä, A., Maunula, L., von Bonsdorff, C.-H., & Lyytikäinen, O. (2000). An outbreak of calicivirus associated with consumption of frozen raspberries. *Epidemiology and Infection*, 123, 469–474. <https://doi.org/10.1017/S0950268899003064>
- Prichard, R. (1997). Application of molecular biology in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology*, 71(2), 155–175. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00029-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00029-0)
- Pryke, D. C., & Taylor, R. R. (1995). The use of irradiated food for immunosuppressed hospital patients

- in the United Kingdom. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 8(6), 411–416. <https://doi.org/10.1111/j.1365-277X.1995.tb00336.x>
- Rao, A. V., & Snyder, D. M. (2010). Raspberries and Human Health: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 3871–3883. <https://doi.org/10.1021/jf903484g>
- Reid, T. M. S., & Robinson, H. G. (1987). Frozen raspberries and hepatitis A. *Epidemiology and Infection*, 98(1), 109–112. <https://doi.org/10.1017/S095026880006177X>
- Roberts, R. B., Cowie, D. B., Abelson, P. H., Bolton, E. T., & Britten, R. J. (1955). *Studies of biosynthesis of Escherichia coli*. Washington, D.C.: Carnegie Institution of Washington. Publ.
- Santos, A. L. S., Palmeira, V. F., Rozental, S., Kneipp, L. F., Nimrichter, L., Alviano, D. S., ... Alviano, C. S. (2007). Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(5), 570–591. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00077.x>
- Severino, A. F. P. (2018). *Avaliação da extensão do tempo de prateleira de tomates cereja irradiados por feixe de elétrons*. <https://doi.org/http://hdl.handle.net/10451/36744>
- Shahbaz, H. M., Ahn, J.-J., Akram, K., Kim, H.-Y., Park, E.-J., & Kwon, J.-H. (2014). Chemical and sensory quality of fresh pomegranate fruits exposed to gamma radiation as quarantine treatment. *Food Chemistry*, 145, 312–318. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.052>
- Terry, L. A. (2012). Soft Fruit. In *Crop Post-Harvest: Science and Technology* (pp. 226–246). <https://doi.org/10.1002/9781444354652.ch11>
- Verde, S. C., Trigo, M. J., Sousa, M. B., Ferreira, A., Ramos, A. C., Nunes, I., ... Botelho, M. L. (2013). Effects of Gamma Radiation on Raspberries: Safety and Quality Issues. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 76(4–5), 291–303. <https://doi.org/10.1080/15287394.2013.757256>
- Vuong, C., & Otto, M. (2002). Staphylococcus epidermidis infections. *Microbes and Infection*, 4(4), 481–489. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01563-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01563-0)
- Wright, J. G., Tengelsen, L. A., Smith, K. E., Bender, J. B., Frank, R. K., Grendon, J. H., ... Angulo, F. J. (2005). Multidrug-resistant Salmonella Typhimurium in four animal facilities. *Emerging Infectious Diseases*, 11(8), 1235–1241. <https://doi.org/10.3201/eid1108.050111>
- Yoon, Y., Park, J.-N., Sohn, H.-S., Song, B.-S., Kim, J.-H., Byun, M.-W., & Lee, J.-W. (2011). Modeling the effect of γ -irradiation on reducing total bacterial populations in gochujang intended for consumption by astronauts in space programs. *Food Science and Biotechnology*, 20(2), 377–382. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10068-011-0053-2>